

TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN EL PROTEOMA
Y FOSFOPROTEOMA DE LA CARNE DE VACUNO DE
BAJA CALIDAD PRODUCIDA POR EL ESTRÉS PRE-
SACRIFICIO**

Ariadna Mato Montero

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN BIODIVERSIDADE E CONSERVACIÓN DO MEDIO
NATURAL. DEPARTAMENTO DE ZOOLOXÍA, XENÉTICA E ANTROPOLOXÍA FÍSICA. FACULTADE
DE BIOLOXÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Estudio de las alteraciones en el proteoma y fosfoproteoma de la
carne de vacuno de baja calidad producida por el estrés pre-
sacrificio

Dña. **Ariadna Mato Montero**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, de de 2019

Fdo.: Ariadna Mato Montero





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Estudio de las alteraciones en el proteoma y fosfoproteoma de la carne de vacuno de baja calidad producida por el estrés pre-sacrificio

D. **José Carlos Zapata Babío**, Catedrático del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física.

INFORMA:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Ariadna Mato Montero**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, ... de de 2019

Fdo.: José Carlos Zapata Babío



AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral constituye, para mí, un logro personal, pero de ningún modo individual. Por ello, me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible que haya llegado hasta aquí.

En primer lugar, me gustaría mostrar mi agradecimiento a mi director, el Catedrático D. Carlos Zapata, por proponerme un tema de Tesis Doctoral tan nuevo para mí como apasionante. Agradezco enormemente su dedicación al guiar mis pasos en el camino de la ciencia, inculcándome el cuidado, exigencia y rigor que el trabajo de investigación requiere.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, ya que estos años no hubieran sido lo mismo sin ellos. A María por el cariño y paciencia con el que me has enseñado a manejar en el laboratorio. Gracias por escucharnos y aconsejarnos siempre, contigo hemos aprendido que *“las peras siempre caen maduras”* y que no siempre *“está todo el pescado vendido”*. A Javier por estar siempre dispuesto a echar una mano, por las largas charlas que hemos compartido y por enseñarme a ver la vida desde un punto de vista totalmente distinto al mío. A Raquel por haber sido una amiga. Seguro que siempre tendremos la suerte que hace que nos sentemos en el sitio correcto del tren. A Dani, por los buenos momentos y las risas compartidas, y por mantener siempre el buen humor. Gracias a los cuatro y a todos los compañeros que he conocido a lo largo de estos años, por los momentos compartidos tanto dentro como fuera del laboratorio.

Je voudrais remercier à tous mes collègues de l'UMRH INRA de m'avoir accueilli si gentiment. Je tiens tout particulièrement à remercier ma tutrice, Dr. Brigitte Picard, et Dr. Mohammed Gagaoua et Dr. Claudia Terlow, de m'avoir donné la possibilité de faire partie d'une si bonne équipe, et m'avoir consacré du temps et de la patience avec mon pénible niveau de français. Je tiens aussi à vous remercier, Jeanne et Pauline, pour votre amitié. Y, por supuesto, gracias Ruth y Leticia, mi estancia no hubiera sido lo mismo sin vosotras.

Gracias a mi familia por acompañarme en la vida y hacer que sea más fácil. Especialmente a mis padres, porque sin todo vuestro apoyo, tanto moral como económico, me hubiera sido imposible llegar hasta aquí.

Gracias a Álvaro por cuidarme, animarme y empujarme siempre hacia adelante.

Gracias a mis amigas de Santiago y a mis amigos de biología, especialmente a Aitor y Antía, por todo vuestro cariño y apoyo.



ABREVIATURAS

1-DE: Electroforesis mono dimensional (*One-dimensional electrophoresis*)

2-DE: Electroforesis bidimensional (*Two-dimensional electrophoresis*)

2-DE PAGE: Electrophoresis bidimensional en geles de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Two- dimensional electrophoresis*)

ACN: Acetonitrilo (*Acetonitrile*)

ACTA1: Actina, alfa, músculo esquelético (*Actin, alpha, skeletal muscle*)

AFG3L2: Proteína 2 como AFG3 (*AFG3-like protein 2*)

ATP5B: ATP sintetasa, subunidad beta, mitocondrial (*ATP synthase subunit beta, mitochondrial*)

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CAPZA2: Subunidad alfa-3 de la proteína de caperuza de la actina F (*F-actin-capping protein subunit alpha-2*)

CCBP2: Proteína 2 de unión a quimioquina (*Chemokine binding protein 2*)

CFL2: Cofilina-2 (*Cofilin-2*)

CHAPS: Ácido α -Ciano-4-hidroxycinámico (*α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*)

CHCA: Ácido ciano-4-hidroxycinámico (*Cyano-4-hydroxycinnamic acid*)

CI: Intervalo de confianza (*Confidence Interval*)

CKM: Creatina kinasa tipo-M (*Creatin kinase M-type*)

CPS1: Carbamoil-fosfato sintetasa (*Carbamoyl-phosphate synthase*)

DFD: Oscura, firme y seca (*Dark, Firm, Dry*)

DTT: Ditiotreitól (*Dithiothreitol*)

ENO3: Beta-enolasa (*Beta-enolase*)

ESI: Ionización por electroespray (*Electrospray Ionization*)

FC: Fold Change

FDR: Tasa de descubrimientos falsos (*False Discovery Rate*)

FWHM: Anchura a media altura (*Full Width at Half Maximum*)

GO: Ontología génica (*Gene Ontology*)

HSPB1: Proteína de choque térmico beta-1 (*Heat shock protein beta-1*)

HSPB6: Proteína de choque térmico beta-6 (*Heat shock protein beta-6*)

IEF: Isoelectroenfoque (*Isoelectrofocusing*)

IPG: Gradiente de pH inmovilizado (*Immobilized pH gradient*)

KEGG: Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

LC: Cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*)

LC-MS/MS: Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (*Liquid chromatography–mass spectrometry*)

LT: *longissimus thoracis*

MALDI: Desorción/Ionización láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

M_r : Masa molecular (*Molecular mass*)

MS: Espectrometría de masas (*Mass spectrometry*)

MYL2: Cadena reguladora 2 de la miosina, isoforma ventricular/ músculo cardíaco (*Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform*)

MYL3: Cadena ligera 3 de la miosina (*Myosin light chain 3*)

MYL6B: Cadena ligera 6B de la miosina, álcali, músculo liso y no muscular (*Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle*)

MYLPP: Cadena reguladora 2 de la miosina, isoforma del músculo esquelético rápido (*Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform*)

PGM1: Fosfoglucomutasa-1 (*Phosphoglucomutase-1*)

pH_u: pH último (*ultimate pH*)

pI: Punto isoelectrico (*Isoelectric point*)

PMF: Huella peptídica (*Peptide Mass Fingerprinting*)

PR: Ratio de fosforilación (*Phosphorylation Rate*)

PSA: Persulfato de amonio (*Ammonium persulfate*)

PSE: Pálida, blanda y exudativa (*Pale, Soft and Exudative*)

PSS: Estrés pre-sacrificio (*Pre-Slaughter Stress*)

PTM: Modificaciones postraduccionales (*Post-translational modifications*)

RC: Cambio relativo (*Relative Change*)

SDS: Dodecil sulfato de sodio (*Sulphate Dodecyl Sodium*)

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (*Sulphate Dodecyl Sodium- Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SE: Error estándar (*Standard Error*)

STGAL1: Beta-galactosidasa alfa-2,6-sialiltransferasa (*Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1*)

TEMED: Tetrametiletilendiamina (*Tetramethylethylenediamine*)

TFA: Ácido trifluoroacético (*Trifluoroacetic acid*)

TNNC2: Troponina C tipo 2, rápida (*Troponin C type 2, fast*)

TNNT1: Troponina T, músculo esquelético lento (*Troponin T, slow skeletal muscle*)

TNNT3: Troponina T, músculo esquelético rápido (*Troponin T, fast skeletal muscle*)

TOF: Tiempo de vuelo (*Time Of Flight*)

TPA: Análisis de perfil de textura (*Textural Profile Analysis*)

TPI1: Triosafosfato isomerasa (*Triosephosphate isomerase*)

UPGMA: Método de grupo de pares no ponderado con promedio aritmético (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic averaging*)

UQCRC1: Subunidad 1 del complejo b-c1 del citocromo mitocondrial (*Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial*)

WBSF: Fuerza de cizalla Warner-Braztler (*Warner-Braztler shear force*)

WHC: Capacidad de retención de agua (*Water Holding Capacity*)





RESUMEN



RESUMEN

El estrés pre-sacrificio (PSS) afecta a la calidad de la carne, dando lugar, a carne de bovino de corte oscuro (*Dark Firm Dry*, DFD), de inferior calidad, generando pérdidas económicas a la industria cárnica. El principal objetivo de este trabajo es descifrar los posibles cambios que ocurren en el proteoma y en el fosfoproteoma del músculo *longissimus thoracis* (LT) de bovino, en respuesta al PSS. Para ello se obtuvieron y compararon los perfiles proteómicos y fosfoproteómicos de muestras de carne DFD y control, de terneros de la raza Rubia Gallega, mediante electroforesis bidimensional (2-DE), espectrometría de masas, el tinte específico para fosfoproteínas Pro-Q DPS y herramientas bioinformáticas. Además, se propone una nueva medida para cuantificar la variación tanto en la abundancia como en el nivel de fosforilación, denominada cambio relativo (*relative change*, RC), alternativa a la medida clásica de *fold change* (FC). Un total de 10 proteínas presentaron diferencias estadísticamente significativas en la abundancia, incluyendo proteínas estructurales-contráctiles y enzimas metabólicas. Conjuntamente, un total de 13 proteínas no redundantes presentaron diferencias estadísticamente significativas en el grado de fosforilación, incluyendo proteínas estructurales-contráctiles, enzimas metabólicas, proteínas de choque térmico y la subunidad 1 del complejo b-c1 del citocromo. Los cambios más intensos, tanto en la abundancia como en el grado de fosforilación, se observaron en las isoformas de la cadena ligera reguladora de la miosina (MYLPF). Así, este estudio revela por primera vez, la existencia de cambios en el proteoma y el fosfoproteoma del músculo LT en respuesta al PSS. Además, las isoformas de la cadena ligera y cadena ligera reguladora de la miosina y las distintas isoformas de la troponina identificadas en este estudio, mostraron cambios tanto en la abundancia como en el grado de fosforilación, por lo que parecen ser los biomarcadores más fiables de PSS, en la raza Rubia Gallega.

Palabras clave: *Bos taurus*; *longissimus thoracis*; carne DFD; proteoma de la carne; fosfoproteoma de la carne



ABSTRACT

Pre-slaughter stress (PSS) has a detrimental effect on meat quality, leading to the production of Dark Firm Dry (DFD) meats in cattle, generating great economic losses to the meat industry. The main objective of this study is to unravel, for the first time, the possible changes that take place on the proteomic and phosphoproteomic profiles of the *longissimus thoracis* (LT) bovine muscle, in response to PSS. The proteomic and phosphoproteomic profiles of DFD and control meat samples, from male calves from the Rubia Gallega breed, were obtained and compared. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) coupled with mass spectrometry, the phosphoprotein specific stain Pro-Q DPS and bioinformatics tools were used. Additionally, a new measure named relative change (*RC*) is proposed in this study in order to quantify the changes both in abundance and in the phosphorylation status of the proteins, alternatively to the traditional fold change measure (*FC*). A total of 10 proteins showed statistically significant differences in abundance in response to PSS including structural-contractile proteins and metabolic enzymes. Moreover, a total of 13 non-redundant proteins showed statistically significant differences in their phosphorylation level, including structural-contractile proteins, metabolic enzymes, small heat shock proteins and the cytochrome b-c1 complex subunit 1. It is noteworthy that the myosin regulatory light chain isoforms (MYLRF) showed the most intensive changes both in abundance and in their phosphorylation status. Therefore, this study reveals for the first time, the existence of changes in the proteome and phosphoproteome profiles of LT bovine muscle, in response to PSS. Moreover, the myosin light chain and myosin regulatory light chain isoforms and the distinct troponin isoforms identified in this study, showed variations both in abundance and in the phosphorylation level between sample groups. Therefore, they are proposed to be the most suitable biomarkers of PSS in Rubia Gallega breed.

Key words: *Bos taurus*; *longissimus thoracis*; DFD meat; meat proteome; meat phosphoproteome



RESUMO

O estrés pre-sacrificio (PSS) afecta á calidade da carne, dando lugar, a carne de bovino de corte escuro (*Dark Firm Dry*, DFD), de inferior calidade, xerando perdas económicas á industria cárnica. O principal obxectivo deste traballo é descifrar os posibles cambios que ocorren no proteoma e no fosfoproteoma do músculo *longissimus thoracis* (LT) de bovino, en resposta ao PSS. Para iso, obtivéronse e comparáronse os perfís proteómicos e fosfoproteómicos de mostras de carne DFD e control, de tenreiros da raza Rubia Galega, mediante electroforesis bidimensional (2-DE), espectrometría de masas, o tinte específico para fosfoproteínas Pro-Q DPS e ferramentas bioinformáticas. Ademais, propónse unha nova medida para cuantificar a variación tanto na abundancia como no nivel de fosforilación, denominada cambio relativo (*relative change*, RC), alternativa á medida clásica de *fold change* (FC). Un total de 10 proteínas presentaron diferenzas estadisticamente significativas na abundancia, incluíndo proteínas estruturais-contráctiles e enzimas metabólicas. Conxuntamente, un total de 13 proteínas non redundantes presentaron diferenzas estadisticamente significativas no grado de fosforilación, incluíndo proteínas estruturais-contráctiles, enzimas metabólicas, proteínas de choque térmico e a subunidade 1 do complexo b-c1 do citocromo. Os cambios máis intensos, tanto na abundancia como no grado de fosforilación, observáronse nas isoformas da cadea lixeira reguladora da miosina (MYLPP). Así, este estudo revela por primeira vez, a existencia de cambios no proteoma e no fosfoproteoma do músculo LT en resposta ao PSS. Ademais, as isoformas da cadea lixeira e cadea lixeira reguladora da miosina e as distintas isoformas da troponina identificadas neste estudo, mostraron cambios tanto na abundancia como no grado de fosforilación, polo que parecen ser os biomarcadores máis fiables de PSS, na raza Rubia Galega.

Palabras chave: *Bos taurus*; *longissimus thoracis*; carne DFD; proteoma da carne; fosfoproteoma da carne





EXTENSIVE SUMMARY



EXTENSIVE SUMMARY

The term pre-slaughter stress (PSS) refers to the stress that an animal suffers during the pre-slaughter period. The pre-slaughter period comprehend the time since the animal leaves the farm until its entry into the knocking box. During this phase, the animal is exposed to a lot of potential stressor such as handling, transport, water and food deprivation and novelty. Numerous studies have demonstrated that PSS have a detrimental effect on the normal conversion of muscle to meat. Once the animal dies, the blood supply stops and the metabolism changes from aerobic to anaerobic, consuming glycogen and accumulating lactic acid. Consequently, the pH falls from 7 to values around 5.5. This process of acidification is a key event for the conversion of muscle to high quality meat. However, when the animal is exposed to PSS, the secretion of catecholamines is enhanced, promoting the consumption of muscle glycogen reserves prior to slaughter. Thus, the normal acidification process is altered by the lack of glycogen *post mortem*, leading to the formation of dark, firm and dry (DFD) meats, lower in quality. This type of meat occurs when the pH at 24 h *post mortem* or ultimate pH (pH_u), is higher than 6.0. At this pH values, proteins denaturation is reduced, maintaining the water tightly bound, which increases the water holding capacity (WHC) and the muscle absorbs the light, leading to the darker colour of this kind of meat. Therefore, DFD meats are rejected by the consumers, generating important economic losses to the meat industry.

Traditionally, biological sciences such as genetics, cellular biology and physiology, have been applied in order to reveal the molecular mechanisms responsible of meat quality. Nonetheless, during the last years, proteomics has been widely used when it comes to meat study. Proteomics is defined as the study of the proteins and their isoforms, post-translational modifications (PTMs), structure and protein interaction networks. Proteomics in meat study, allows to obtain proteomic maps and, also, to reveal candidate proteomic biomarkers of meat quality parameters, i.e. pH, colour, texture and WHC. Moreover, proteomics enables the study of PTMs, such as phosphorylation. In fact, phosphorylation is one of the most widespread PTM in nature. In muscle, reversible phosphorylation plays a key role in muscle contraction *in vivo*, and, *post mortem*, in protein degradation and even in the *rigor mortis* development. Accordingly, protein phosphorylation has been proved to affect meat quality parameters. In spite of this, there are no previous studies of the alterations that occur on bovine muscle proteome and phosphoproteome, in response to PSS.

The main objective of this work is to unravel, for the first time, the proteome and phosphoproteome changes in the *longissimus thoracis* (LT) bovine muscle, in response to PSS. Our results will facilitate the comprehension of the molecular mechanisms associated to PSS in cattle and its consequential effects on meat quality. Moreover, this work will determinate if reversible LT protein phosphorylation plays a fundamental role in response to PSS and its effects on meat quality. Additionally, this study will allow identifying candidate proteomic biomarkers linked to PSS in cattle.

In this study, a total of four biological replicates were used, selected out of a total of 75 ten month old male calves, from Rubia Gallega Spanish breed. Meat samples were classified according to the meat quality parameters (pH, colour, WHC and texture), into DFD and normal or control. LT muscle was analysed at 24 h *post mortem*. Meat samples were lyophilized and proteins were purified using the Clean-Up kit. Proteins were separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). The gels obtained were stained with Pro-Q Diamond fluorescent dye, for phosphoprotein detection; and with SYPRO[®] Ruby fluorescent dye, for total protein detection. Digitalized gel images were analysed and compared using the PDQuest Advanced software v. 8.0.1. The protein spots of interest were identified by mass spectrometry (LC-MS/MS, MALDI TOF and MALDI TOF/TOF). In order to determine qualitative changes in volume, from each protein spot, the traditional fold change measure (*FC*) was used. The *FC* is defined as $FC = V_{DFD}/V_C$, where V_{DFD} is the mean volume of each protein spot in DFD meat samples; and V_C is the mean volume of each spot of control meat samples. Additionally, a new measure named relative change (*RC*) is proposed in this study, in order to determine the volume variation of each spot between meat samples. The *RC* measure is given by $RC = DV/DV_{max}$ where $DV = V_{DFD} - V_C$ is the difference in volume between samples; and DV_{max} is the maximum *DV* value observed in the study. *RC* has the advantage over *FC* that it ranges between -1 and +1, instead of $-\infty / +\infty$ range of *FC*, providing us with a more accurate information about quantitative and qualitative changes in volume of the proteins spots, between DFD and control meat samples. On the other hand, the phosphorylation rate (*PR*) of each spot was calculated as $PR = P/T$, where P is the volume of each spot stained with Pro-Q DPS and T is the volume of the same spot, stained with SYPRO[®] Ruby. The *FC* in phosphorylation level was given by $FC = PR_{DFD}/PR_C$, where PR_{DFD} and PR_C are the mean *PR* values of a given spot in DFD and control meat samples, respectively. The *RC* in phosphorylation level is defined as $RC = DPR/DPR_{max}$, where

$DPR = PR_{DFD} - PR_C$ is the *PR* difference of a given protein spot between meat samples, and DPR_{max} is the highest *DPR* value across the study. The statistical analysis of the differences in volume and in phosphorylation status between meat samples was carried out using the bootstrap method. Finally, bioinformatics and cluster analysis of the protein of interest were performed.

A total of 10 out of 19 protein spot with statistically significant differences in volume, in response to PSS, were adequately identified, including structural proteins: two fast skeletal myosin regulatory light chain 2 isoforms (MYLPF, MYLRF-1), three myosin light chain isoforms (MYL3, MYL6B, MYL2), troponin C type 2 (TNNC2) and cofilin-2 (CFL2); and metabolic enzymes: triosephosphate isomerase (TPI1), beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase (STGAL1) and ATP synthase (ATP5B). When it comes to phosphoproteome variation in response to PSS, a total of 32 protein spot showed statistically significant variations in phosphorylation status, between DFD and control meat samples. Those 32 spots contained only 13 non-redundant phosphoproteins, including seven structural protein: actin, alpha skeletal muscle (ACTA1), different isoforms of the myosin regulatory light chain 2 (MYLRF, MYL2), myosin light chain 6B (MYL6B), two isoforms of the troponin T (TNNT1, TNNT3) and a F-actin-capping protein subunit alpha-2 (CAPZA2); metabolic enzymes: phosphoglucomutase-1 (PGM1), beta-enolase (ENO3) and creatin kinase M-type (CKM); a member of the electron transport chain (UQCRC1); and two members of the heat shock protein family (HSPB1, HSPB6). Among them, MYL6B turned out to be the most overrepresented protein in control meats when compared to DFD, while the two MYLRF isoforms underwent the highest increase in DFD meats. Interestingly, the two MYLRF isoforms identified in this study, showed the highest level of phosphorylation in response to PSS too, followed by TNNT3, TNNT1, CAPZA2 and HSPB1. It is noteworthy that all the phosphoproteins with statistically significant differences in response to DFD, identified in this study, were part of a unique interaction network when using the STRING v10.5 software, which suggest that reversible protein phosphorylation can generate a rapid and extensive response to PSS.

The present study reveals, for the first time, that the LT bovine muscle proteome and phosphoproteome are influenced by PSS. The proteins that showed significant changes in volume and in phosphorylation level help explain DFD meat characteristics, such as an augmentation in WHC and tenderness variations. Moreover, myosin light chain isoforms, fast

skeletal myosin regulatory light chain 2 and troponin isoforms showed significant differences both in volume and phosphorylation level. Thus, these proteins could be proposed as consistent biomarkers of PSS in Rubia Gallega bovine breed.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL ESTRÉS PRE-SACRIFICIO (PSS)	3
1.2. EL ESTRÉS PRE-SACRIFICIO Y LA CONVERSIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE	5
1.2.1. Estructura muscular	5
1.2.2. Conversión del músculo en carne	10
1.2.3. Efectos del PSS en la conversión del músculo en carne	12
1.2.4. Parámetros físico-químicos de calidad de la carne en carne DFD	15
1.2.4.1. El pH	15
1.2.4.2. El color	15
1.2.4.3. La capacidad de retención de agua	17
1.2.4.4. La textura de la carne	19
1.3. LA PROTEÓMICA	21
1.4. LA PROTEÓMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA CARNE	23
1.5. EL FOSFOPROTEOMA Y LA CALIDAD DE LA CARNE	25
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. ANIMALES Y MUESTRAS	35
3.2. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA CARNE	35
3.3. EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS	36
3.4. CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	37
3.5. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	37
3.6. TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON PRO-Q DIAMOND	38
3.7. TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON SYPRO® RUBY	39
3.8. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES	39
3.9. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS: LC-MS/MS Y MALDI TOF/TOF	40
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
3.11. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	45
3.12. ANÁLISIS DE CLÚSTER	46
4. RESULTADOS	47

4.1. CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CARNE CONTROL Y DFD	49
4.2. PERFILES PROTEÓMICOS Y FOSFOPROTEÓMICOS EN MUESTRAS CONTROL Y DFD MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE)	51
4.2.1. Cambios en el proteoma global de las muestras de carne del músculo LT en respuesta al PSS	54
4.2.2. Cambios en el fosfoproteoma global de las muestras de carne del músculo LT en respuesta al PSS	57
4.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	59
4.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS ASOCIADOS AL ESTRÉS PRE-SACRIFICIO (PSS) MEDIANTE LOS ESTADÍSTICOS <i>FC</i> Y <i>RC</i>	68
4.5. CATEGORIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS CON CAMBIOS ASOCIADOS AL PSS	74
4.6. REDES DE INTERACCIÓN PROTEICA	87
4.7. ANÁLISIS DE CLÚSTER UPGMA	91
5. DISCUSIÓN	95
5.1. CAMBIOS EN EL MAPA PROTEÓMICO DEL MÚSCULO LT BOVINO EN RESPUESTA PSS	97
5.2. CAMBIOS EN EL MAPA FOSFOPROTEÓMICO DEL MÚSCULO LT BOVINO EN RESPUESTA PSS	102
5.3. COMPARACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL MAPA PROTEÓMICO Y FOSFOPROTEÓMICO DEL MÚSCULO LT BOVINO EN RESPUESTA PSS	108
6. CONCLUSIONES	111
7. BIBLIOGRAFÍA	117
8. ANEXOS	135



INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL ESTRÉS PRE-SACRIFICIO (PSS)

El término estrés se refiere al estado alterado de comportamiento, emocional y fisiológico que presenta un animal al enfrentarse a una situación percibida como amenazadora y que difiere de su estado normal (Terlouw *et al.* 2008). El período pre-sacrificio es aquel comprendido entre el momento en el que el animal abandona la granja de cría hasta que es introducido en el conducto de contención para su sacrificio. Durante este período ocurre el transporte, un aumento del manejo y el contacto con el ser humano, cambios sociales y contacto con nuevos individuos, así como la privación de agua y comida (Ferguson & Warner 2008). Estos eventos pueden generar dos tipos de estrés: el estrés psicológico, causado por la novedad, el contacto con nuevos individuos, la separación del grupo social en el que el animal se ha criado y el manejo; y el estrés físico, causado por factores como el hambre, la sed, la fatiga, etc. (Grandin 1997; Terlouw *et al.* 2008).

En el ganado bovino, uno de los factores psicológicos más estresantes es la novedad, en cuanto que el animal debe separarse de su ambiente familiar y su grupo social y mezclarse con individuos que no le son familiares o permanecer aislado. (Mounier *et al.* 2006; Grandin 1997; Terlouw *et al.* 2008). No obstante, uno de los agentes estresantes psicológicos más relevantes es el miedo. El miedo es una respuesta neuroendocrina llevada a cabo por el sistema nervioso simpático y el eje hipotálamo pituitario adrenal, que se desencadena a causa de agentes estresantes agudos que requieren una respuesta rápida por parte del animal. Durante la respuesta al miedo, el eje hipotálamo pituitario adrenal promueve la liberación de glucocorticoides, como el cortisol, desde la corteza adrenal. Pero además, el sistema nervioso simpático se encarga de promover la secreción de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina), las cuales tienen efecto sobre el metabolismo energético en la lipólisis, glucogenólisis y la gluconeogénesis, para proporcionar mayor cantidad de glucosa a los músculos y al cerebro. Además, también tienen efecto sobre el metabolismo de las proteínas, disminuyendo el grado de degradación proteica (Grandin 1997; Ferguson & Warner 2008; Muchenje *et al.* 2009). El miedo se manifiesta a modo de cambios fisiológicos como el aumento de la frecuencia cardíaca, de la frecuencia respiratoria, aumento de la temperatura corporal, etc.; y con cambios en el comportamiento, como intentos de huida, estado de alerta o agresiones (Grandin 1997). Las respuestas de miedo son variables entre individuos, ya que dependen de

una compleja combinación entre factores genéticos y las experiencias previas de cada animal. Si los animales han tenido una buena experiencia durante el manejo en ocasiones anteriores, se estresarán en menor medida, en el futuro, que aquellos individuos cuyo trato haya sido deficiente. Sin embargo, factores como el temperamento del animal o su rango social dentro del grupo, tienen una gran influencia en el nivel de estrés que cada individuo presentará frente al manejo. En concreto, el temperamento es un factor heredable y estable a lo largo del tiempo. De hecho, en ganado bovino, el temperamento es variable entre razas. Un temperamento más excitable hará más difícil la adaptación a procedimientos de manejo no dañinos, mientras que un temperamento más calmado facilitará dicha adaptación, reduciendo los niveles de estrés (Grandin 1997; Ferguson & Warner 2008).

Una forma de disminuir el nivel de estrés en los animales, es exponer a los individuos a los nuevos estímulos de forma gradual. En aquellos animales domesticados, familiarizados con el contacto humano y con el manejo, las respuestas de estrés son menores, por lo que es posible que la domesticación reduzca las reacciones fisiológicas del sistema nervioso. Se ha demostrado que los animales se acostumbran a los procedimientos no aversivos, sin embargo, nunca se habituarán a aquellos que sí lo son. La forma en que un animal sea tratado al principio de su vida determinará, por tanto, sus respuestas fisiológicas ante futuros agentes estresantes (Grandin 1997; Terlouw *et al.* 2008).

Incluso si las condiciones pre-sacrificio son favorables, los animales siguen sometidos a potenciales agentes estresante físicos, tales como el clima, la temperatura, el contacto humano, la estabulación en el matadero, la privación de agua y alimento, la carga y descarga o el propio transporte al matadero (vibraciones del camión, golpes, mareos, fatiga). Al igual que el miedo, estos factores de estrés también activan el sistema nervioso-simpático-adrenomedular y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, generando un incremento en los niveles de catecolaminas y glucocorticoides, respectivamente (Chrousos 1998; Miranda de la Lama *et al.* 2014).

Con la intención de evitar, en la medida de lo posible, el estrés pre-sacrificio, la Unión Europea ha establecido leyes que limitan el tiempo de transporte u obligan a hacer paradas en el trayecto; y leyes que disponen que a los animales se les debe suministrar agua y comida durante el viaje, de ser necesario (Directiva 95/29/CE del Consejo, de 29 de junio de 1995, por la que se modifica la Directiva 91/628/CEE). También es obligado que los mataderos

proporcionen alimento a aquellos animales que no vayan a ser sacrificados durante las primeras 12 h posteriores al transporte. Otra práctica obligada para evitar situaciones de estrés, dolor o sufrimiento innecesario a los animales, es el aturdimiento previo al sacrificio (Directiva 93/119/CE del Consejo, de 22 de diciembre de 1993). En el caso del ganado bovino, el aturdimiento puede ser eléctrico, el cual consiste en hacer pasar una corriente eléctrica a través del cerebro; o bien mecánico, introduciendo un perno cautivo en el cráneo (Terlouw *et al.* 2008).

La exposición de los animales a agentes estresantes, tanto físicos como psicológicos, durante el período pre-sacrificio, desencadena la secreción de catecolaminas, promoviendo el consumo de las reservas de glucógeno. Esto da lugar a un incremento del valor del pH a las 24 h *post mortem* o pH último (pH_u) de la carne a valores por encima de 6,0, generando carne de inferior calidad (Chulayo & Muchenje 2016; Romero *et al.* 2017). Se ha comprobado que pasadas de 24 a 48 h de estabulación en el matadero, posteriores al transporte, el ganado vacuno recupera un estado similar al que presentaba previamente a dicho transporte, ya que durante el período de estabulación los animales pueden rehidratarse y reponer las reservas de glucógeno. (Terlouw *et al.* 2008; Romero *et al.* 2017).

1.2. EL ESTRÉS PRE-SACRIFICIO Y LA CONVERSIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE

1.2.1. Estructura muscular

La estructura básica del músculo consiste en haces de células o fibras musculares. Rodeando la membrana de las fibras musculares se encuentra una red de tejido conectivo llamada endomisio. Los haces de fibras están, a su vez, rodeados por el perimisio, donde se hallan los principales vasos sanguíneos y nervios. Finalmente, el epimisio, rodea toda la estructura muscular (Fig. 1). Los principales constituyentes del tejido conectivo son el colágeno, inextensible y no ramificado; y la elastina, ramificada, que compone las fibras elásticas de este tejido (Lawrie 1998; Warriss 2000; Tornberg 1996).

ESTRUCTURA MUSCULAR

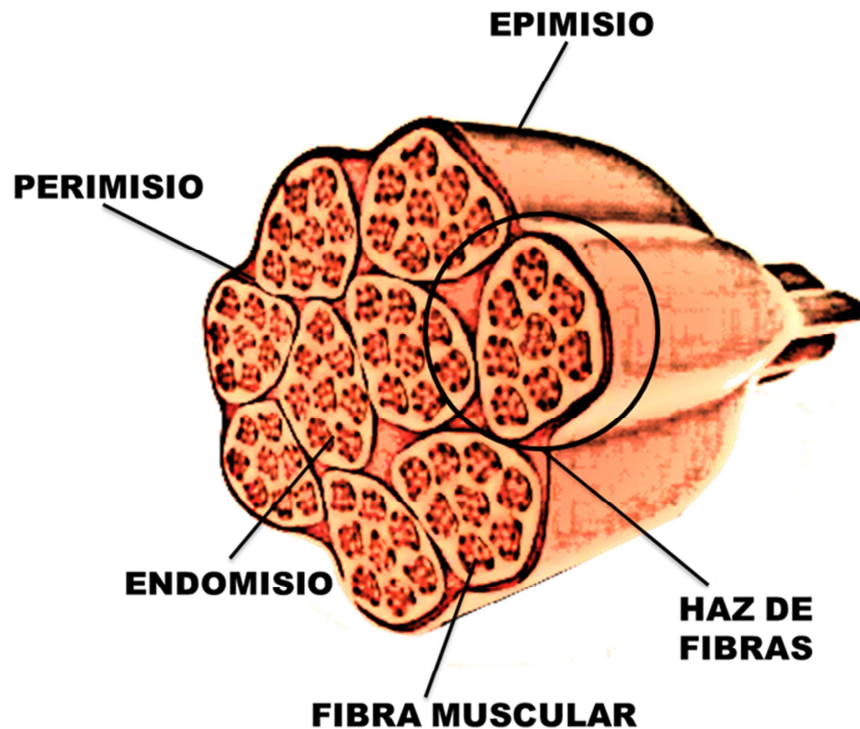


Fig. 1. Estructura de la fibra muscular

Las fibras o células musculares, también llamadas miofibras, son células largas que pueden tener varios centímetros de longitud y un diámetro que oscila entre 60-100 μm . Su membrana recibe el nombre de plasmalema y su plasma se denomina sarcoplasma. En el sarcoplasma se alojan más de un núcleo y los orgánulos celulares. Son células multinucleadas ya que normalmente se forman por la fusión de varios mioblastos. En el retículo plasmático de las fibras musculares, denominado retículo sarcoplasmático, se almacenan los iones de Ca^{2+} necesarios para la contracción muscular. Además, en el sarcoplasma también existen lisosomas que contienen enzimas proteolíticas, gránulos de glucógeno y las proteínas sarcoplasmáticas, entre las que se incluyen enzimas proteolíticas y glucolíticas (Tornberg 1996; Lawrie 1998; Warriss 2000).

Las fibras musculares se clasifican en fibras rojas y fibras blancas. Las fibras rojas se caracterizan por presentar un metabolismo principalmente aerobio u oxidativo, por lo que contienen un mayor número de mitocondrias, y un contenido más alto en mioglobina. Desde

un punto de vista funcional, las fibras rojas son fibras de contracción lenta, características de los músculos encargados de mantener la posición. Por otro lado, las fibras blancas presentan un metabolismo predominantemente anaerobio o glucolítico, con menor cantidad de mitocondrias y de mioglobina, lo que les confiere la apariencia de color blanco. Son fibras de contracción rápida, y se encuentran en músculos que llevan a cabo movimientos rápidos pero intermitentes. Además, existen algunas fibras con capacidad tanto glucolítica como oxidativa. Estas se conocen como fibras rosas (Warriss 2000).

Embebidas en el sarcoplasma de las células musculares se encuentran mil o dos mil miofibrillas, situadas longitudinalmente. Cada miofibrilla está a su vez formada por filamentos paralelos, denominados miofilamentos, organizados para formar los elementos contráctiles del músculo, que se denominan sarcómeros (Fig. 2). Los miofilamentos se clasifican en finos y gruesos. Los miofilamentos gruesos están principalmente compuestos por la proteína contráctil miosina y los finos por actina. (Tornberg 1996; Lawrie 1998; Warriss 2000).

La actina y la miosina son las principales proteínas musculares, encargadas de la contracción muscular. La actina existe como moléculas globulares de 42 kDa, conocidas como G-actina, que mediante un proceso de polimerización, forman la F-actina. Junto con la actina, los miofilamentos finos están constituidos por la troponina y la tropomiosina. Estas últimas se encargan de controlar la contracción muscular mediante la unión de iones Ca^{2+} . La tropomiosina tiene forma de cuerda y se sitúa a lo largo de la doble hélice de F-actina. En los intervalos de separación entre las tropomiosinas, se sitúa la troponina. La troponina se compone de tres subunidades: troponina C, troponina I y troponina T. La troponina T sirve de anclaje a la troponina I y a la troponina C. La función de troponina I es la de inhibir a la actomiosina-ATPasa, mientras que la troponina C une los iones de calcio, suprimiendo la acción inhibitoria de la troponina sobre la actina.

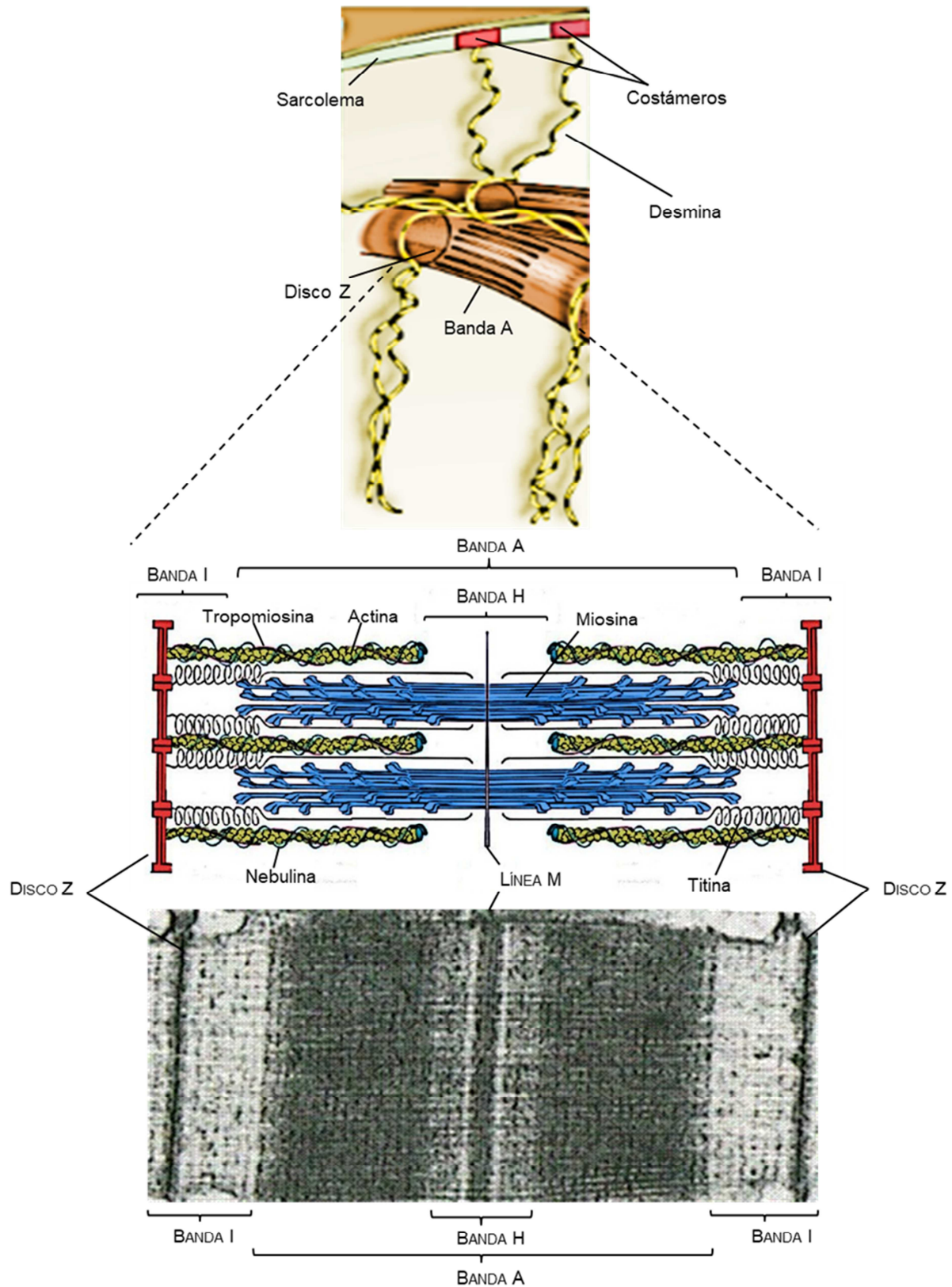


Fig. 2. Imagen representativa de la estructura molecular del sarcómero del músculo esquelético y de las principales proteínas que lo conforman.

Por otro lado, la miosina consiste en dos unidades idénticas entrelazadas, formadas por una cola unida a una cabeza mediante una región flexible a la que se denomina cuello. La miosina tiene un peso molecular de 520 kDa. La cabeza consiste en dos unidades con forma de pera. La cola es una doble hélice que se compone de dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras. Son las colas de cientos de miosinas las que se juntan para formar los miofilamentos gruesos. Al asociarse, las miosinas se organizan de forma que la mitad de las cabezas se orientan en sentido opuesto a la otra mitad, quedando una zona intermedia solamente formada por las colas, denominada banda H (Fig. 2). Durante la contracción muscular, las cabezas de las miosinas sufren cambios conformacionales, uniéndose y soltándose de las actinas de los filamentos finos (Lawrie 1998; Warriss 2000).

La organización de los miofilamentos se mantiene gracias al citoesqueleto de las fibras musculares. El citoesqueleto está compuesto por proteínas entre las que destacan la titina o conectina y la nebulina (Fig. 2). La titina tiene un peso molecular de 3.000 kDa, constituye los filamentos gap y se encuentra entre la línea M hasta la mitad de la banda I. Se encarga de unir la miosina al disco Z. La nebulina, por otro lado, une la banda I con la línea Z, formando una estructura en forma de red encargada de mantener la alineación de los sarcómeros adyacentes. Su peso molecular es de 500 kDa y mantiene la orientación de los filamentos. Además, la proteína desmina constituye los filamentos intermedios que mantienen la red de miofibrillas. Las miofibrillas se unen lateralmente y al sarcolema a nivel de la banda I mediante unas estructuras llamadas costámeros, constituidas por la proteína vinculina (Tonberg 1996; Lawrie 1998; Warriss 2000).

El músculo esquelético se denomina músculo estriado. Esto es debido a que las células musculares, vistas bajo el microscopio, muestran un patrón estriado. Estas estriaciones están formadas por bandas alternas de proteína, denominadas bandas A (más densas), formadas básicamente por los filamentos gruesos y bandas I (menos densas), compuestas principalmente por filamentos finos, divididas por la línea Z (Lonergan *et al.* 2010).

La contracción muscular se inicia como respuesta a un estímulo nervioso que provoca la despolarización del plasmalema. Esta despolarización se transmite al retículo plasmático dando lugar a la liberación de iones Ca^{2+} al sarcoplasma, aumentando la concentración de los mismos, que normalmente se mantiene baja gracias a las bombas de Ca^{2+} presentes en el retículo plasmático. Los iones Ca^{2+} se unen a la troponina C, alterando las posiciones de las

tres subunidades de troponina. Esto provoca un desplazamiento de la troponina, haciendo que deje libre el sitio de unión de la actina a la miosina. La miosina se une entonces a la actina formando el complejo actomiosina, que actúa como una ATPasa, hidrolizando ATP y generando la contracción muscular. Una vez que los niveles de Ca^{2+} vuelven a concentraciones normales, la inhibición por parte de la tropomiosina se reestablece y la contracción muscular cesa (Warriss 2000).

1.2.2. Conversión del músculo en carne

El proceso de conversión del músculo en carne comienza en el momento en el que el animal es sacrificado. La circulación sanguínea cesa, deteniendo el aporte de oxígeno y de nutrientes, e impidiendo la eliminación de los productos del metabolismo. En este momento, y al igual que el resto de células, las fibras musculares tienen que enfrentarse a la falta de oxígeno, a pesar de que todavía existen concentraciones residuales del mismo en la hemoglobina y la mioglobina. Durante esta fase, el músculo todavía continúa siendo extensible gracias al ATP resintetizado por la creatina fosfato. A esta fase se la conoce como fase *pre-rigor*, y dura entre 3 a 6 horas (Gregory & Grandin 1998; Lonergan *et al.* 2010; D'Alessandro & Zolla 2013; Lana & Zolla 2016). A partir de ese momento, el metabolismo pasa de aerobio a anaerobio (Lana & Zolla 2016). Debido a la ausencia de circulación sanguínea, se acumula el lactato formado a partir del piruvato resultado de la glucólisis anaerobia, al no poder ser reciclado en el ciclo de Cori. Esto lleva a una disminución del pH, dando lugar a valores de pH que, en un músculo como el *longissimus thoracis* de bovino, caen desde alrededor de 7,2 a un pH a las 24 h *post mortem* o pH_u de 5,5 (Gregory & Grandin 1998; Warriss 2000). A este proceso se le conoce como proceso de acidificación de la carne. En bovino, este proceso dura entre 15 y 36 horas. El aumento en la concentración de hidrogeniones hace que la repulsión entre los miofilamentos se vea reducida, contribuyendo a la contracción lateral de las fibras musculares (Gregory & Grandin 1998; Warriss 2000; Lonergan *et al.* 2010; D'Alessandro & Zolla 2013; Lana & Zolla 2016). Durante la contracción muscular se necesita ATP tanto para el mantenimiento de las bombas de Ca^{2+} , como para la unión de la actina y la miosina. Una vez que se consumen las reservas de glucógeno y el nivel de ATP disminuye, las bombas de Ca^{2+} quedan inactivas, lo que impide mantener baja la concentración de Ca^{2+} en el sarcoplasma. Además, el ATP ya no es suficiente para deshacer la formación del complejo actomiosina, estableciéndose la fase de

rigor mortis propiamente dicha (Gregory & Grandin 1998). Posterior a la fase de *rigor mortis*, aparece la fase de enternecimiento. En esta fase intervienen distintos sistemas de proteasas: calpaínas, catepsinas, proteosoma 20 y caspasas (Lana & Zolla 2016). El sistema de calpaínas está compuesto por diversas isoformas de estas proteasas y su inhibidor endógeno, la calpastatina. Las calpaínas son proteasas de cisteína que se dividen en μ -calpaínas y m-calpaínas, en función de la concentración de Ca^{2+} que necesitan para ser activas (micro y milimolar respectivamente). Los principales sustratos de las calpaínas son proteínas como la troponina, la tropomiosina, la desmina e incluso la nebulina y la titina. Las calpastatinas, inhibidoras endógenas de las calpaínas, también requieren Ca^{2+} para unirse a las calpaínas y, normalmente, en una concentración menor del que requieren las calpaínas para ser activas. (Lonergan *et al.* 2010; Lana & Zolla 2016).

El siguiente sistema de proteasas que parece intervenir en el proceso de envejecimiento de la carne es el sistema de catepsinas. Éstas son exo- y endo- peptidasas de cisteína, aspártico y serina. Algunos autores rechazan la intervención de estas peptidasas en el proceso de enternecimiento de la carne, debido a que se encuentran confinadas en los lisosomas. Sin embargo, parece que el bajo pH que presenta la carne en este momento, favorece la liberación de algunos miembros de esta familia (Lonergan *et al.* 2010; Lana & Zolla 2016).

El proteosoma 20 es, también, un firme candidato de ser partícipe en el proceso de enternecimiento de la carne, ya que se encuentra altamente expresado en el músculo y es independiente de ATP. Además, se ha demostrado que degrada actina, miosina, tropomiosina y nebulina *in vitro* (Robert *et al.* 1999), y que su inhibición genera patrones que difieren de aquellos presentes *in vivo* (Houbak *et al.* 2008; Lana & Zolla 2016).

Por último, a las caspasas, proteasas específicas de cisteína-aspartato, también se les atribuye un papel en el proceso de enternecimiento de la carne, al menos por el hecho de intervenir en la rotura de las proteínas asociada a la apoptosis, ya que éste es el destino final de todas las células musculares (Lana & Zolla 2016).

1.2.3. Efectos del PSS en la conversión del músculo en carne

La manera en que los animales son tratados durante el período previo al sacrificio puede alterar las características normales de la carne, dando lugar a carne denominada PSE (de sus siglas en inglés *Pale, Soft, Exudative*) o DFD (de sus siglas en inglés, *Dark, Firm, Dry*) (Gregory & Grandin 1998; Adzitey & Nurul 2011).

Durante la transformación del músculo en carne, tiene lugar el proceso de acidificación de la misma (Gregory & Grandin 1998; Warriss 2000). Al morir el animal, el sistema circulatorio se detiene, el aporte de sangre a los músculos cesa y con ello el aporte de oxígeno. Sin embargo el metabolismo continúa hasta que la cadena de transporte de electrones falla a causa de la falta de oxígeno. En este momento se recurre al metabolismo anaerobio para producir ATP a partir de la degradación del glucógeno mediante la glucogenólisis. A medida que el glucógeno se degrada, se va acumulando ácido láctico, ya que éste no puede ser eliminado por el sistema circulatorio. Como resultado, el músculo se acidifica (Gregory & Grandin 1998; Warriss 2000). Debido a la acidificación del músculo y a la disminución en los niveles de ATP, las proteínas se degradan, reduciéndose la capacidad del músculo para retener agua. Las pérdidas de agua también se deben a que a valores de pH de 5,5, la actina y la miosina alcanzan su punto isoelectrico, por lo que, al no tener carga eléctrica, pierden el agua que normalmente está unida a ellas. Además, la acumulación de hidrogeniones causa un decrecimiento en las fuerzas de repulsión de las proteínas, aumentando la contracción de la red de miofilamentos, generando, con ello, pérdidas de agua. Como consecuencia de las pérdidas de agua retenida, la mioglobina, el pigmento muscular, se verá a través de una red densa de moléculas de agua. Esto, junto con la degradación de las proteínas, incrementa la dispersión de la luz en la fibra muscular, por lo que la carne oscura y translúcida del animal vivo se transforma en una carne más pálida y opaca (Smulders 1986; Gregory & Grandin 1998; Warriss 2000; Terlouw *et al.* 2008).

El transporte de larga duración, los períodos largos de estabulación en el matadero y, en general, todos aquellos agentes estresantes que provoquen estrés previo al sacrificio en el animal, junto con la actividad física, generan un consumo de las reservas de glucógeno, disminuyendo la cantidad del mismo disponible *post mortem*, lo cual altera el proceso de acidificación normal de la carne, resultando en un pH entre las 12-48 h *post mortem* mayor que 6,0 (Terlouw *et al.* 2008; Adzitey & Nurul 2011; Romero *et al.* 2017). Este pH más

básico da lugar a una menor desnaturalización de las proteínas, por lo que el agua se mantiene fuertemente unida y no se forman apenas exudados. Como la concentración de hidrogeniones es menor, se mantienen las fuerzas de repulsión de las proteínas, por lo que la contracción de la red de miofilamentos se reduce, aumentando la capacidad de retención de agua. Los músculos absorben la luz, obteniendo una apariencia más oscura. Además, el oxígeno no es capaz de penetrar esta estructura, por lo que solo hay una capa fina de mioglobina oxigenada (roja), permitiendo que se vea el color violáceo de la mioglobina reducida que se encuentra por debajo (Warriss 2000; Adzitey & Nurul 2011). Debido a las características de este tipo de carne, se le denomina carne de corte oscuro o carne DFD, de las siglas en inglés de oscura, firme y seca (*Dark, Firm and Dry*) (Newton & Gill 1980) (Fig. 3).



Fig. 3. Imágenes representativas de un corte de carne DFD (izq.) y normal (dcha.).

Los músculos más proclives a producir carne DFD son aquellos que presentan un mayor número de fibras rojas y oxidativas, ya que tienen menor concentración de glucógeno, por lo que éste es consumido rápidamente haciendo a estos músculos más susceptibles de dar lugar a este tipo de carne (Newton & Gill 1980; Adzitey & Nurul 2011).

La carne PSE, por el contrario, no se produce a causa de la disminución de las reservas de glucógeno debido a un PSS prolongado, sino que ocurre cuando el animal sufre estrés agudo en el momento del aturdimiento y sacrificio (Gregory & Grandin 1998; Adzitey & Nurul 2011). En este caso, el metabolismo acelerado promueve la degradación anaerobia del glucógeno, lo cual provoca que la acidificación del músculo ocurra antes que en la carne normal, cuando la carcasa aún está caliente. Así, se consideran PSE aquella carne cuyo pH a los 45 minutos *post mortem* es menor a 5,8 (Warriss 2000; Adzitey & Nurul 2011). La combinación de pH ácido y alta temperatura hace que las proteínas solubles del músculo se aglutinen y precipiten, formando una capa de precipitado proteico encima de las mioproteínas estructurales que da lugar a la apariencia pálida de este tipo de carne. Esto conlleva, además, a la liberación del agua asociada a las proteínas, lo que disminuye su jugosidad (Gregory & Grandin 1998; Adzitey & Nurul 2011). Por tanto, este tipo de carne se caracteriza por ser pálida en color, exudativa y menos jugosa o blanda, adquiriendo su nombre del inglés *Pale, Soft and Exudative* o PSE.

A pesar de que hoy en día se acepta que ambas condiciones puedan darse en todas las especies, la carne PSE apenas se describen en ganado bovino (Adzitey & Nurul 2011). La carne DFD, sin embargo, ocurre tanto en carne porcina como bovina, por lo que genera grandes pérdidas económicas, ya que la calidad de la carne va a ser lo que determine su elección por parte del consumidor. Esta carne tiene peor aspecto, peores características de procesamiento, menor rendimiento y se estropea más rápidamente (Adzitey & Nurul 2011). No obstante, el término calidad de carne es un término difícil de definir, ya que depende en última instancia de las preferencias del consumidor, que varían en función del trasfondo cultural, experiencias previas, etc. (Warriss 2000). Warriss (2000) distingue dos tipos de calidad: la calidad funcional y la calidad de conformidad. La primera, que es la que normalmente se equipara al término calidad de carne, hace referencia a los atributos deseables en la carne, como pueden ser la terneza o el sabor. Por otro lado, la calidad de conformidad se refiere a aquellos productos que cumplan con exactitud las exigencias del consumidor. En general, cuando se habla de calidad de carne, se hace referencia al rendimiento y composición de la misma (tamaño del músculo, cantidad de grasa, etc.), su apariencia y las características tecnológicas (color, capacidad de retención de agua, etc.), su palatabilidad (textura, jugosidad, terneza, etc.) y, por último, la salubridad y la calidad ética. (Warriss 2000; Muchenje *et al.* 2009).

La clasificación de la carne en DFD o normal se lleva a cabo mediante la determinación del pH y de los parámetros físico-químicos de calidad de la misma, esto es, el color, la capacidad de retención de agua y la terneza. Para considerarse de buena calidad, la carne debe tener un color atractivo y ser jugosa y tierna (Muchenje *et al.* 2009).

1.2.4. Parámetros físico-químicos de calidad de la carne en carne DFD

1.2.4.1. El pH

El pH_u de la carne tiene una gran influencia sobre el resto de los parámetros de calidad. Esto se debe a que el proceso de acidificación normal de carne es clave para la obtención de carne de alta calidad (Warriss 2000). La determinación del valor del pH de la carcasa suele realizarse en el músculo *longissimus thoracis*, ya que este músculo tiene alto valor comercial. Además, este músculo tiene tendencia a presentar un amplio rango de valores de pH y, en general, más altos, con respecto a otros músculos (Smulders 1986). En carne DFD, el pH_u es mayor que 6,0, debido a que el consumo de las reservas de glucógeno a causa del PSS, disminuye la cantidad del mismo disponible *post mortem*, alterando el proceso de acidificación normal de la carne (Terlouw *et al.* 2008; Adzitey & Nurul 2011; Romero *et al.* 2017).

1.2.4.2. El color

El color de la carne es uno de los factores más importantes en cuanto a la elección por parte del consumidor (Muchenje *et al.* 2009). Viene determinado por la concentración de los pigmentos hemo: hemoglobina y mioglobina. Esta última constituye entre un 50 y un 90% del total de los pigmentos musculares, por lo que es la distribución y el estado físico-químico de la misma, lo que va a afectar principalmente a la percepción del color de la carne (Smulders 1986; Lawrie 1998; Warriss 2000).

La mioglobina en su forma reducida [$\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})$] es color púrpura. Cuando la carne se expone al aire, se produce el proceso de oxigenación de la carne (*blooming*) mediante el cual la mioglobina se oxigena dando lugar a la oximioglobina [$\text{Fe}^{2+}(\text{O}_2)$], de color rojo brillante, característico de la carne fresca. Al oxidarse la mioglobina o la oximioglobina, se forma metamioglobina [$\text{Fe}^{3+}(\text{OH}^-)$], de color marrón. En función de la proporción relativa entre la mioglobina reducida (Mb), la oximioglobina (MbO_2) y la metamioglobina (MetMb), el color

de la carne variará (Fig. 4). Por ello, es necesario exponer la carne al aire durante al menos una hora para poder determinar su color (Smulders 1986; Lawrie 1998; Warriss 2000).

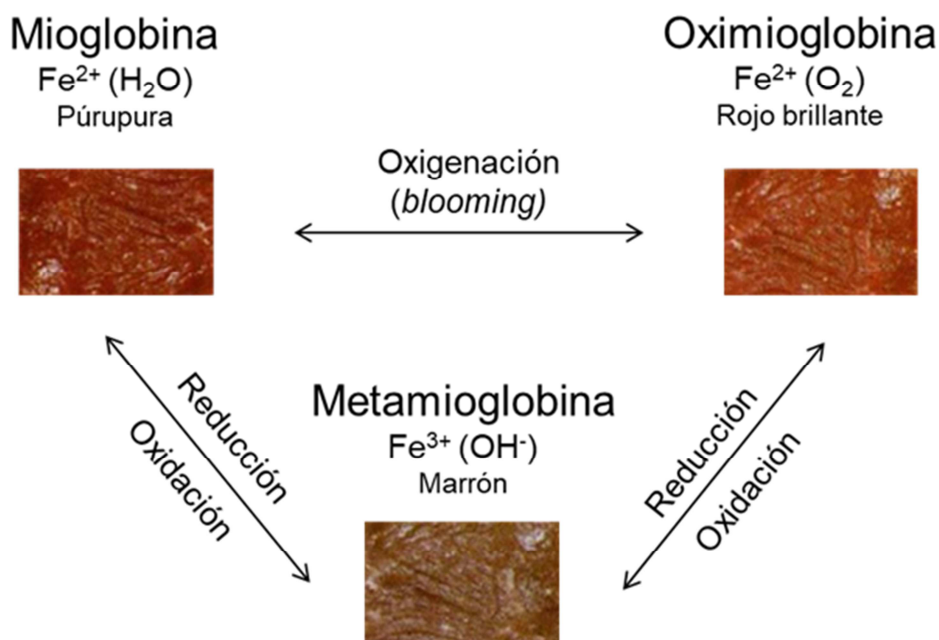


Fig. 4. Esquema representativo del proceso de oxigenación y oxidación de la mioglobina.

La concentración de mioglobina varía según la especie, la raza, el sexo, la edad del animal, etc. y el tipo de músculo. Normalmente es más elevada en los músculos de animales más activos, por ejemplo, aquellos de animales criados en sistemas de cría extensivos (Warriss 2000). En un músculo como el *longissimus thoracis et lumborum*, cuya actividad es menor que la de otros músculos, el contenido en mioglobina es menor (Lawrie 1998). Otros factores que intervienen en el color de la carne son la alimentación y el consumo de carotenoides, los residuos de hemoglobina, la grasa intramuscular, y el pH_u del músculo (Lawrie 1998; Warriss 2000; Abril *et al.* 2001; Muchenje *et al.* 2009). Además, el color va a depender de la reflectancia de la mioglobina a través de la red de moléculas de agua que se encuentra en la superficie de la carne (Smulders 1986). En la carne fresca, el estado químico más frecuente de la mioglobina es la oximioglobina. Durante un cierto período *post mortem*, continúa existiendo actividad mitocondrial, de modo que el citocromo continúa consumiendo oxígeno. Este oxígeno proviene del aire al que se encuentra expuesta la carne y que penetra en la misma. Se establece, entonces, un balance entre la concentración de oxígeno que penetra en la carne, aquel que es usado por las enzimas del citocromo y el que interviene en el proceso de

oxigenación de la mioglobina para formar oximioglobina (Lawrie 1998). Ocurre que a pH 7,0, el consumo de oxígeno por parte del citocromo aumenta entre el 50 y el 100%. Además, a pH alrededor de 7,0, las proteínas musculares se encuentran por encima de su pI , por lo que retendrán el agua que tienen unida, limitando la difusión del oxígeno externo al interior del músculo. Estos dos factores tienen como consecuencia una disminución en la cantidad de oxígeno disponible para la oxigenación de la mioglobina y por tanto, se establece una predominancia de la mioglobina reducida, con un color más violáceo, dando lugar a la apariencia oscura característica de la carne DFD (Bendall & Taylor 1972; Lawrie 1998).

Existen diferentes formas de determinar el color de la carne, como el uso de cartas de color, escalas fotográficas, etc. Sin embargo, el sistema usado comúnmente es el CIElab. El CIElab es un espacio de color especificado por la Comisión Internacional de l'Eclairage (CIE), que consiste en tres coordenadas: L^* , a^* y b^* (Fig. 5). La coordenada L^* representa la luminosidad (espacio negro-blanco). Los valores a^* y b^* son las coordenadas cromáticas, donde a^* mide los valores de verde-rojo y b^* los de azul-amarillo. Las coordenadas cromáticas determinan el color y la saturación (Smulders 1986; Warriss 2000).

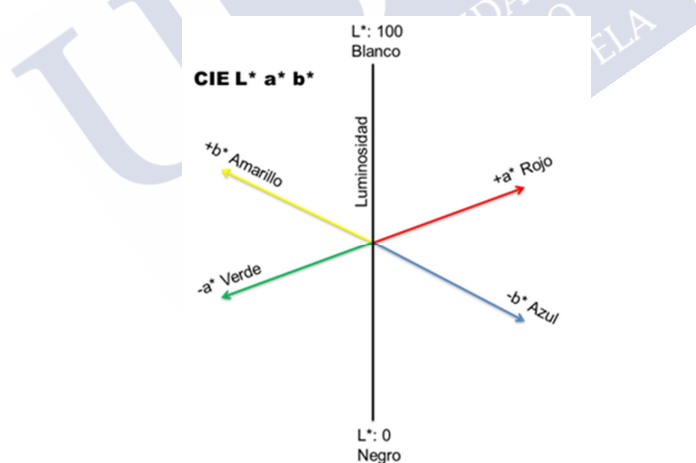


Fig. 5. Coordenadas del espacio de colores CIElab.

1.2.4.3. La capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua o WHC, de sus siglas en inglés *water holding capacity*, se define como la capacidad de la carne para retener agua al aplicar algún factor o fuerza externa, como la presión, el corte, el calor, la sal, etc. (Smulders 1986; Warriss 2000; Muchenje *et al.* 2009). El músculo está compuesto en su mayoría por agua que recibe el

nombre de mioagua. Este agua se encuentra de tres maneras: unida a las proteínas a través de los grupos hidrofílicos cargados de las mismas, la cual constituye menos de un 5% del mioagua total; como agua inmovilizada, debido a la configuración de los miofilamentos y las fuerzas electrostáticas de las proteínas, pero no directamente unida a ellas; y como agua libre o agua suelta, mantenida por fuerzas de capilaridad (Lawrie 1998; Pearce *et al.* 2011). Debido a que las miofibrillas retienen la mayor parte del mioagua, los cambios estructurales de éstas serán los responsables de los movimientos del agua durante la conversión del músculo en carne. El agua asociada a las proteínas apenas presenta movilidad y se mantiene fuertemente unida incluso cuando se aplican fuerzas externas. El agua inmovilizada puede movilizarse durante la conversión del músculo en carne y la maduración de la misma, debido a alteraciones de la estructura muscular y las variaciones en el pH. El agua libre, por último, se moviliza fácilmente. (Smulders 1986; Lawrie 1998; Pearce *et al.* 2011). Cuando se consumen las reservas de glucógeno *post mortem*, la concentración de ATP disminuye a niveles críticos, por lo que los filamentos de actina y miosina se mantienen fuertemente unidos, reduciendo el espacio que queda para el agua entre ellos. De hecho, la cantidad de exudados que se forman dependen principalmente del grado de contracción de los miofilamentos. La desintegración de las membranas celulares durante el *rigor mortis* también contribuye a la movilización del agua al espacio extra-miofibrilar. Además, a causa de la bajada de pH, el aumento de hidrogeniones reduce las fuerzas de repulsión electrostática entre las proteínas miofibrilares, disminuyendo la repulsión entre los filamentos y contribuyendo a la contracción lateral del sarcómero. Esto reduce el espacio disponible para almacenar agua entre las miofibrillas, aumentando la cantidad de agua en el espacio extra-miofibrilar (Lawrie 1998; Warriss 2000; Pearce *et al.* 2011). La bajada del pH a valores de alrededor de 5,5 hace que las proteínas musculares alcancen su pI , por lo que las cargas positivas y negativas de los aminoácidos se igualan, las proteínas presentan entonces una carga total igual a cero y pierden el agua que tenían asociada. Por tanto, el pH de la carne afecta a la capacidad de retención de agua. En carne DFD, cuyo pH_u es mayor que 6,0, las proteínas no alcanzarán su pI , conservando sus cargas y el agua asociada a ellas. Asimismo, se mantendrá el fenómeno de repulsión entre aquellas proteínas que presentan la misma carga, aumentando el espacio disponible entre las miofibrillas para retener el mioagua. Todo esto conlleva a un incremento de la WHC en la carne DFD (Lawrie 1998; Warriss 2000; Muchenje 2009; Pearce *et al.* 2011). Por otro lado, la degradación del citoesqueleto contribuye, en cierta medida, a reducir las pérdidas de agua, ya

que esta degradación minimiza la contracción lateral de las miofibrillas. Sin embargo, a medida que avanza la degradación de las proteínas, se produce la liberación del agua que llevan asociada, incrementando las pérdidas por goteo (Pearce *et al.* 2011).

Para determinar la WHC, se mide la diferencia en peso debido a la pérdida de agua o la cantidad de agua exudada tras almacenar la muestra de carne durante un período de tiempo, cocinarla o aplicar una fuerza sobre la misma. Por ejemplo, una forma de determinar la WHC es mediante la medida de las pérdidas por goteo (*drip loss*). El *drip loss* o pérdidas por goteo se define como la pérdida de fluidos en forma de gota de los cortes de carne debido a la contracción de las proteínas musculares (actina y miosina). Otra forma de medir la WHC, es mediante la determinación de las pérdidas por cocción (*cooking loss*). Esta medida determina la cantidad de agua que pierde la carne al ser cocinada. Se calcula como la diferencia de peso en tanto por ciento que hay entre muestras de carne fresca y cocinada (Warriss 2000; Muchenje 2009; Pathare & Roskilly 2016).

1.2.4.4. La textura de la carne

La ternera o textura de la carne es el parámetro más importante en cuanto a la aceptabilidad de la carne por parte del consumidor (Jeleníková *et al.* 2008). Como los demás parámetros físico-químicos de la carne, la ternera varía en función de factores intrínsecos del animal (raza, sexo, edad, etc.) y factores ambientales, como el estrés pre-sacrificio o el proceso de envejecimiento de la carne (Jeleníková *et al.* 2008; Muchenje *et al.* 2009). La variabilidad en la ternera de la carne viene determinada por aspectos tales como los cambios que se producen en la estructura proteica de las miofibrillas durante el proceso de transformación del músculo en carne, la composición del tejido conectivo o la longitud del sarcómero. De todos ellos, el más importante parece ser la degradación proteica que tiene lugar durante el proceso de envejecimiento de la carne. Los sistemas de calpaínas, catepsinas, etc., llevan a cabo la proteólisis de las proteínas durante este proceso de envejecimiento, haciendo que la ternera de la carne aumente. Junto con esto, las bacterias presentes en las carcasas liberan la enzima colagenasa, la cual provoca la disrupción de la estructura proteica de las miofibrillas y del tejido conectivo. El nivel de degradación proteica es variable entre animales, lo que puede ser la causa de la variabilidad que existe en la ternera o textura de la carne (Muchenje *et al.* 2009).

La carne DFD generalmente se relaciona con una mayor ternieza (Gregory & Grandin 1998). Sin embargo, la relación del pH_u con la ternieza es controvertida. Algunos estudios sugieren una relación lineal directa entre el pH de la carne y la ternieza (Silva *et al.* 1999). Sin embargo, en otros trabajos, esta relación se demuestra curvilínea, es decir, la ternieza disminuye a valores de pH intermedios de entre 5,8-6,3, mientras que aumenta a valores superiores o inferiores a éstos (Jeleníková *et al.* 2008). La relación curvilínea entre ambos parámetros se ha encontrado en carne cruda, mientras que la relación lineal ocurriría en estudios con carne que había sido cocinada previamente a ser estudiada, de modo que la temperatura jugaría un papel importante, ya que la linealidad de la relación aumenta con la temperatura de cocción (Silva *et al.* 1999; Jeleníková *et al.* 2008). Una posible explicación a la relación curvilínea encontrada entre la ternieza y el pH es la acción de las enzimas proteolíticas. A pH_u alto, se verá incrementada la acción de las proteasas neutras como las calpaínas, mientras que a pH bajo, aumentará la actividad de proteasas ácidas como las catepsinas. A pH intermedios ninguno de los grupos de proteasas se verá favorecido, resultando en una carne más correosa. Por otro lado, un pH_u alto favorece la capacidad de retención de agua, lo que contribuye a la mayor ternieza en carne DFD (Jeleníková *et al.* 2008).

Para determinar la textura o ternieza de la carne se utilizan texturómetros. Estos aparatos miden la resistencia de un tejido al corte o a la compresión. El test más usado es el test de fuerza de corte de Warner-Braztler (*Warner-Braztler shear force*, WBSF). Éste consiste en colocar la muestra de carne en el agujero de una hoja de acero inoxidable de 1 mm y medir la fuerza, en Newtons, aplicada por la cuchilla durante un período de tiempo, o la longitud de penetración de la cuchilla en la carne (Smulders 1986; Ruiz de Huidobro *et al.* 2005; Pathare & Roskilly 2016). Otro método comúnmente utilizado, es el análisis de perfiles de texturas (*textural profile analysis*, TPA). Este test mide la fuerza, en Newtons, que realiza un texturómetro al comprimir una pieza de carne. La principal ventaja de TPA es que además de medir la ternieza de la carne, mide otros parámetros como son la cohesión y la elasticidad. (Ruiz de Huidobro *et al.* 2005).

1.3. LA PROTEÓMICA

Según la definición clásica dada por Wilkins *et al.* (1996), el proteoma se define como el complemento proteico expresado a partir de un genoma. Es decir, el proteoma es el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma en una célula, tejido u organismo, en un momento dado y bajo unas condiciones ambientales determinadas. El área científica que se encarga del estudio del proteoma es la proteómica. (Wilkins *et al.* 1996; Bendixen 2005; Hollung *et al.* 2007). La proteómica es, entonces, el estudio de las proteínas, las isoformas proteicas, sus modificaciones postraduccionales (PTMs), la estructura de las proteínas y las redes de interacción entre proteínas (Blackstock & Malcolm 1999; Tyers & Mann 2003).

La técnica estándar clásica y la más eficiente a la hora de separar mezclas complejas de proteínas gracias a su robustez y reproducibilidad, es la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2-DE PAGE) (Blackstock & Malcolm 1999; Rabilloud & Lelong 2011; Zhang *et al.* 2014). La 2-DE PAGE acopla el isoelectroenfoque (IEF) y geles de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) para revelar mapas de proteínas desnaturalizadas, en base a dos parámetros: el punto isoelectrico (pI), en la primera dimensión; y la masa molecular (M_r) en la segunda (Weiss & Görg 2007). El uso de los gradientes de pH inmovilizados (IPGs) en la primera dimensión, ha permitido mejorar la resolución y reproducibilidad de la técnica. La visualización de las proteínas en los geles 2-DE PAGE se llevaba a cabo, tradicionalmente, por medio de tinciones como el azul de Coomassie o la tinción de plata. Hoy en día, el uso de tinciones fluorescentes ha mejorado la sensibilidad de la técnica, aumentando su rango dinámico. Así, la 2-DE permite estudiar los cambios globales que acontecen en el proteoma de una célula, tejido, fluido, etc., en distintas situaciones, al detectar las variaciones en el pI y la M_r de las proteínas que indican posibles fenómenos de fragmentación peptídica o la presencia de PTMs como la glucosilación y la fosforilación (Blackstock & Malcolm 1999; Weiss & Görg 2007; Rabilloud *et al.* 2010; Rabilloud & Lelong 2011; Mouzo *et al.* 2018). Asimismo, las tinciones específicas para fosfoproteínas y glucoproteínas, como el Pro-Q Diamond y el Pro-Q Emerald, respectivamente, facilitan esta labor (Agrawal & Thelen 2005; Metha D'Souza 2018). Conjuntamente, el desarrollo de las técnicas de espectrometría de masas (MS) han incrementado la eficiencia de la 2-DE, al proporcionar un método de identificación de las proteínas más sensible que los usados tradicionalmente, véase Western Blot o la secuenciación clásica de Edman (Blackstock & Malcolm 1999; Tyers & Mann

2003). De esta manera, el enfoque experimental clásico en proteómica consiste en separar, en primer lugar, el extracto proteico de la muestra mediante 2-DE, a continuación, extraer los *spots* de proteína de interés del gel y digerirlos con tripsina u otra peptidasa y, finalmente, identificar los péptidos resultantes mediante MS.

A pesar de que la conjunción 2-DE y MS es una herramienta clave en proteómica, la 2-DE presenta ciertas limitaciones. Es una técnica laboriosa que consume mucho tiempo y solo permite realizar un número limitado de geles a la semana. Además, las proteínas hidrofóbicas, las proteínas con alto peso molecular (> 100 kDa) y las proteínas muy ácidas o muy básicas, presentan una mala resolución en los geles 2-DE (Blackstock & Malcolm 1999; Ong & Pandey 2001; Rabilloud *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2014). De esta forma, cuando el objetivo del estudio requiere solventar estas limitaciones, se aplican otras técnicas proteómicas, como son la electroforesis mono dimensional (1-DE) acoplada a MS, o a la proteómica *gel-free*, en la que se prescinde del uso de geles (Ong & Pandey 2001; Zhou *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2014). En los últimos años, la técnicas *gel-free* se han tratado de imponer a la tradicional 2-DE, ya que presenta una serie de ventajas en comparación con ésta, permitiendo estudiar un mayor número de proteínas en menos tiempo y a partir de una cantidad de muestra menor. Sin embargo, la proteómica *gel-free* tiene limitaciones frente a la 2-DE, en cuanto a que dificulta la identificación de las isoformas de las proteínas y de las PTMs al no ofrecer información directa sobre las variaciones en el *pI* o la *M_r*. Además, la redundancia de péptidos y sitios de fosforilación existente entre las isoformas de una proteína, dificulta la asignación de un péptido o un grupo fosforilo específico a una isoforma concreta. Únicamente la presencia de péptidos únicos permite eliminar la ambigüedad en la identificación de las proteínas, en este tipo de técnicas (Cottrell 2011; Zhou *et al.* 2012; Mouzo *et al.* 2018).

El uso de la MS en proteómica requiere la transferencia de los péptidos o proteínas a una fase gaseosa, evitando, en la medida de lo posible, la degradación de la muestra. En proteómica, se utilizan principalmente dos métodos de ionización de las proteínas: la ionización por electrospray (ESI) y la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) (Blackstock & Malcolm 1999; Zhang *et al.* 2014). Previamente al análisis por MS, las proteínas pueden ser digeridas en péptidos, generalmente mediante la enzima peptidasa tripsina, lo que se conoce como proteómica *bottom-up*. Por otro lado, las proteínas pueden analizarse intactas, directamente, mediante MS, estrategia conocida como proteómica *top-*

down (Zhang *et al.* 2014). Independientemente del tipo de estrategia seguida, los espectros de MS obtenidos corresponden a péptidos individuales. Los espectros de MS se comparan con una base de datos de secuencias proteicas o ácido-nucleicas, para inferir qué proteínas están presentes en la muestra (Cottrell 2011).

1.4. LA PROTEÓMICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA CARNE

En los últimos años, la proteómica ha sido ampliamente empleada en el estudio de la carne. Tradicionalmente, se han aplicado la genética, la biología celular, la fisiología y otras ciencias biológicas, con el objetivo de caracterizar los mecanismos biológicos responsables de los parámetros de calidad de la carne, esto es, la textura, la capacidad de retención de agua y el color (Bendixen 2005). El auge del uso de técnicas proteómicas en este ámbito, surge debido a que, a diferencia de los métodos tradicionales, la proteómica permite el estudio de cientos de proteínas de manera simultánea (Bendixen 2005; Hollung *et al.* 2007; Paredi *et al.* 2012). De esta manera, el gran desarrollo de la proteómica, así como de otras metodologías post-genómicas, ha significado un gran avance para la agricultura, en cuanto al entendimiento de los mecanismos biológicos que subyacen a la patología y fisiología de los animales, con el fin de mejorar la calidad de la carne, la cual es la principal fuente de proteínas en las sociedades occidentales (Bendixen 2005; D'Alessandro & Zolla 2012). Así, la proteómica se presenta como una herramienta excepcional para comprender las variaciones en la estructura y abundancia de las proteínas y los numerosos procesos bioquímicos implicados en la transformación del músculo en carne (Bendixen 2005; Hollung *et al.* 2007; D'Alessandro & Zolla 2012; Paredi *et al.* 2012).

La proteómica en el estudio de la carne tiene dos objetivos fundamentales: por un lado la obtención de mapas proteómicos que permiten catalogar el conjunto entero de proteínas presentes en una célula, tejido u organismo; y por otro lado, encontrar biomarcadores mediante la realización de análisis paralelos de patrones de expresión proteicos, lo que se conoce como proteómica comparativa. En ambos casos, la metodología proteómica más utilizada ha sido la electroforesis bidimensional (Bendixen 2005; Hollung *et al.* 2007; Almeida *et al.* 2016).

Bouley *et al.* (2004) realizaron el primer mapa del proteoma del músculo *semitendinosus* de la raza bovina Charolesa, con el objetivo de establecer una técnica estándar basada en la 2-

DE y MS, que permitiese analizar y determinar las proteínas presentes en el músculo estriado bovino. Identificaron 129 proteínas con funciones metabólicas, estructurales y contráctiles y de defensa celular. En la misma línea, Almeida *et al.* (2009) aplicaron esta combinación 2-DE y MS para obtener, por primera vez, el mapa proteómico del músculo *gastrocnemius* del conejo. En este caso, identificaron con éxito un total de 45 proteínas implicadas en la defensa celular, el aparato contráctil y la estructura celular y el metabolismo de la glucosa.

Por otro lado, la proteómica comparativa permite identificar las diferencias en el proteoma de distintos músculos, por ejemplo, para determinar la especificidad muscular de la estabilidad del color *post mortem* (Joseph *et al.* 2012; Yu *et al.* 2017). Sin embargo, gran parte de los esfuerzos han sido dedicados a identificar las diferencias en un mismo músculo bajo diferentes situaciones. Estos estudios permiten identificar aquellas proteínas que presentan cambios cualitativos o cuantitativos y proponer posibles biomarcadores proteómicos. Un ejemplo de esto es el estudio de las diferencias en el proteoma del músculo estriado bovino en animales criados bajo distintos sistemas de cría (Shibata *et al.* 2014; Almeida *et al.* 2016). Otro ejemplo, es el estudio de los cambios que se producen en el proteoma del músculo durante la conversión del músculo en carne y su relación con la calidad de la misma, a fin de comprender mejor los mecanismos moleculares que tienen lugar durante este proceso (Lametsch *et al.* 2003; Jia *et al.* 2007; Bjarnadóttir *et al.* 2010; Paredi *et al.* 2012). Así, se detectó un posible fenómeno de agregación o precipitación de las proteínas, debido a la bajada del pH o a modificaciones *post mortem* en las propias proteínas, en la fracción insoluble del músculo *longissimus thoracis* bovino, a 1 h y 48 h *post mortem* (Bjarnadóttir *et al.* 2010). También fue posible establecer una relación entre la degradación de la actina y las cadenas pesadas de la miosina, a 72 h *post mortem*, con la textura de la carne (Lametsch *et al.* 2003). Junto con esto, existen trabajos donde se comparan grupos de carne de alta y baja calidad. En un estudio donde se comparaban estos dos grupos de carne proveniente del músculo *longissimus thoracis et lumborum* de terneros de la raza coreana Coreana Hanwoo, detectaron una relación entre la proteína 1 del complejo-T, la inositol 1,4,5-trifosfato y la proteína de choque térmico HSP27 y el aumento de la dureza de aquella carne de menor calidad, proponiéndolas como marcadores candidatos de la calidad de la carne (Kim *et al.* 2008). Otro ejemplo, es el estudio llevado a cabo por Zuo *et al.* (2016) donde se comparó el proteoma del músculo *longissimus lumborum* de toros Yak, que presentaban diferente capacidad de retención de agua, a los 0, 1 y 7 días *post mortem*. Detectaron enzimas

metabólicas, proteínas estructurales, proteínas relacionadas con el estrés y proteínas de transporte que presentaban diferencias en la expresión en los días 0, 1 y 7. Además, la proteómica comparativa se ha usado para determinar los efectos del estrés causado por distintos tiempos de transporte sobre el músculo *pectoralis superficialis* del pollo de engorde Ross 308, mediante 2-DE acoplada a MS (Zanetti *et al.* 2013). Sin embargo, previos a la publicación de los resultados expuestos en el presente trabajo, no se conocen estudios sobre los efectos del PSS sobre el proteoma del músculo bovino. Por tanto, este ha sido el primer estudio que muestra las diferencias en el proteoma del músculo LT bovino en respuesta al PSS.

1.5. EL FOSFOPROTEOMA Y LA CALIDAD DE LA CARNE

La fosforilación es una de las PTMs más extendidas en la naturaleza. Es una modificación reversible que juega un papel muy importante en la regulación de los procesos biológicos tales como el metabolismo, la transducción de señales, la proliferación y la diferenciación celular (Graves & Krebs 1999). En el músculo, la fosforilación es igual de importante. *In vivo*, la fosforilación modula la función sarcomérica, la interacción entre proteínas y tiene un papel clave en la contracción muscular. En el músculo *post mortem*, juega un papel clave en la degradación de las proteínas e incluso el desarrollo del *rigor mortis* (D'Alessandro *et al.* 2012a, b; Chen *et al.* 2016; de Souza Rodrigues *et al.* 2017). Por consiguiente, la fosforilación de las proteínas influye en el desarrollo de parámetros de calidad de la carne como la ternura o el color (Huang *et al.* 2011; 2012; 2014; D'Alessandro *et al.* 2012a; Chen *et al.* 2016; Li *et al.* 2017a; 2018a; 2018c; Liu *et al.* 2018). Mediante la aplicación de técnicas proteómicas, a saber, electroforesis mono y bidimensional y MS, D'Alessandro *et al.* (2012a) y Chen *et al.* (2016) establecieron una relación entre los cambios en el estatus de fosforilación de las proteínas durante el proceso de conversión del músculo en carne y la ternura final de la misma, en ganado bovino y ovino. La fosforilación también juega un rol importante en la estabilidad del color de la carne, como así demuestran los estudios llevados a cabo por Li *et al.* (2017a; 2018a; 2018c) en músculo ovino. En ellos se propone que la fosforilación participa en la regulación de la glucólisis y de la estabilidad redox de la mioglobina, afectando a la estabilidad del color de la carne. Conjuntamente, se ha demostrado que factores como la estacionalidad y la estimulación eléctrica de la carne, afectan al grado de fosforilación de las proteínas y, por ende, a la calidad final de la carne (Li

et al. 2015; 2017b). En esta línea, Li *et al.* (2018b) estudiaron las alteraciones en el fosfoproteoma del músculo *longissimus thoracis et lumborum* ovino producidas por factores estresantes como son el transporte y la estabulación previas al sacrificio, con resultados negativos. Sin embargo, este estudio representa la primera evidencia de cambios significativos en el fosfoproteoma del músculo LT bovino, en respuesta al PSS.





OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objetivo fundamental abordar, por primera vez, los cambios potenciales en el proteoma y fosfoproteoma del músculo *longissimus thoracis* (LT) bovino, en respuesta al estrés pre-sacrificio (PSS). Para acometer este objetivo, se obtuvieron y compararon los perfiles proteómicos y fosfoproteómicos de muestras de carne procedentes de terneros de la raza Rubia Gallega, clasificadas como DFD, de peor calidad, procedentes de animales que habían sufrido estrés pre-sacrificio; y normales o control. La obtención de los perfiles proteómicos y fosfoproteómicos de ambos tipos de muestra se llevó a cabo mediante electroforesis bidimensional (2-DE) acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS y MALDI TOF/TOF). Asimismo, se usó el tinte específico Pro-Q DPS para la detección de las fosfoproteínas. Conjuntamente, se aplicaron numerosas herramientas bioinformáticas para la comparación de los perfiles proteómicos y fosfoproteómicos de ambos tipos de muestra. Para cuantificar la variación tanto en el volumen como en el nivel de fosforilación, de los *spots* de proteína con diferencias estadísticamente significativas entre grupos de muestra, en respuesta al PSS, se propuso una nueva medida denominada cambio relativo (*relative change*, *RC*), alternativa a la medida tradicional *fold change* (*FC*). Los resultados obtenidos facilitarán la comprensión de los mecanismos moleculares asociados al PSS en ganado bovino y sus efectos sobre la calidad de la carne, así como ayudarán a dilucidar si la fosforilación reversible de las proteínas del músculo LT bovino juega un papel clave en la respuesta al PSS y en los efectos que este tiene sobre la calidad de la carne. Por otro lado, este estudio permitirá identificar posibles biomarcadores proteómicos asociados al PSS en vacuno.



OBJECTIVES

The main objective of this study is to unravel, for the first time, the proteome and phosphoproteome changes in the *longissimus thoracis* (LT) bovine muscle, in response to pre-slaughter stress (PSS). In order to address this objective, proteomic and phosphoproteomic profiles from meat samples from male calves of Rubia Gallega bovine breed, were obtained and compared. Meat samples were classified as DFD, poorer in quality, from animals that have suffered from PSS; and normal or control. The obtainment of proteomic and phosphoproteomic profiles from DFD and control meat samples, was carried out by two-dimensional electrophoresis (2-DE) coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS and MALDI TOF/TOF). Moreover, specific Pro-Q DPS stain was used for phosphoprotein detection. Furthermore, different bioinformatic tools were used in order to compare the proteomic and phosphoproteomic profiles of both types of meat samples. Alternatively to the traditional measure of fold change (*FC*), a new measure named relative change (*RC*) was proposed to quantify both volume and phosphorylation status changes of the protein spots that showed statistically significant differences between sample groups. The obtained results will help to the comprehension of the molecular mechanisms associated to PSS in cattle and its consequential effects on meat quality. Additionally, it is intended to determinate if reversible LT protein phosphorylation plays a key role in response to PSS and its effects on meat quality. Moreover, this study will allow identifying candidate proteomic biomarkers linked to stress in cattle.





MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES Y MUESTRAS

Para la realización de este estudio se han usado un total de cuatro réplicas biológicas de carne control (no-DFD) y DFD, seleccionadas a partir de un total de 76 terneros, con una edad media de 10 meses, de la raza Rubia Gallega (España). La selección de dichas muestras se llevó a cabo de acuerdo con los parámetros de calidad de la carne que permiten la distinción entre carne normal o control, y carne DFD. La existencia de estas últimas se tomaron como indicador de que los animales habían sufrido estrés pre-sacrificio (PSS). La incidencia de carne DFD en este estudio fue del 5,3%. Todos los terneros provenían de la misma granja y se sacrificaron el mismo día, con el fin de homogeneizar las condiciones experimentales. Los animales se transportaron a un matadero acreditado (Lugo, España) un día antes del sacrificio. Para proceder al sacrificio, se les aturdió con un perno cautivo y se les sacrificó siguiendo los reglamentos de la Unión Europea (Directiva del Consejo 93/119/EEC). Se extrajo el músculo *longissimus thoracis* (LT) de la mitad izquierda de las carcasas obtenidas, las cuales habían sido previamente congeladas en una cámara frigorífica, durante 24 h a 2°C con una humedad relativa del 98%. Se sustrajeron dos filetes de la quinta costilla, de un grosor de 2,5 cm. Éstos se conservaron en condiciones de vacío y se mantuvieron en dichas condiciones de refrigeración para su transporte. El primero de los filetes se utilizó para determinar el color y el pH, así como para el posterior análisis del proteoma. Este filete se liofilizó bajo condiciones óptimas según Carpentier *et al.* (2007) y posteriormente se congeló a -80°C hasta su uso. El segundo filete se analizó inmediatamente, para realizar los test de textura y determinar la capacidad de retención de agua (WHC).

3.2. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA CARNE

Los parámetros de calidad de la carne medidos en este estudio fueron: el pH, el color, la WHC y los parámetros texturales.

Para la determinación del pH se utilizó un medidor de pH digital portátil (Hanna Instruments, Eibar) equipado con una sonda de penetración.

El color de las muestras de carne se midió en el espacio CIELab [Luminosidad (L^*), abundancia de color rojo (a^*) y abundancia de color amarillo (b^*)] con un espectrofotómetro

portátil (CM-600d, Konica Minolta, Osaka) cuyos ajustes de equipo fueron: lámpara de arco de xenón pulsada, geometría de ángulo de visión 0°, iluminación estándar D65 y tamaño de apertura de 8 mm. Se llevaron a cabo tres medidas para cada muestra. Las medidas siempre se efectuaron en áreas libres de grasa intramuscular, homogéneas y representativas.

La medida de la capacidad de retención de agua se obtuvo en términos de pérdidas por cocción. Con este fin, los filetes se cocinaron dentro de bolsas de envasado al vacío, en un baño de agua con control automático de temperatura (Precisdig, JP Selecta, Barcelona) hasta alcanzar una temperatura interna de 70°C. La temperatura interna se controló mediante termopares tipo K (K23M, Comark, Norwich) conectados a un registrador de datos (Dilligence EVG N3014, Comark). El porcentaje de pérdidas por cocción se midió después de enfriar las muestras en un baño de agua circulatoria fijado a 18°C durante 30 minutos.

Los análisis texturales se realizaron mediante un analizador de texturas (TA-XT2, Stable Micro Systems, Godalming). Para el test Warner-Bratzler (WBSF) se utilizó una cuchilla de cizalla con un corte de ranuras triangular de última generación (1 mm de grosor). Se cortaron completamente cuatro piezas de carne de 1 x 1 x 2,5 cm (alto x ancho x largo). Todas las muestras se cortaron de forma perpendicular a la dirección de la fibra muscular a una velocidad de cruceta de 3,33 mm·s⁻¹. Se determinó la máxima fuerza de corte (Møller 1980) mediante el pico más alto de la curva fuerza-tiempo, el cual representa la máxima resistencia que la muestra presenta al corte. Los análisis de perfil de textura (TPA) se realizaron de acuerdo con Bourne (1978). Para ello, se extrajeron cuatro piezas de carne de 1 x 1 x 1 cm (alto x ancho x largo). Todas las muestras se comprimieron al 80%, de forma perpendicular a la dirección de la fibra muscular, con una sonda de 19,85 cm² de superficie de contacto y una velocidad de cruceta de 1 mm·s⁻¹. La dureza se determinó como la máxima fuerza de la primera compresión de la pieza de carne.

3.3. EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Para la extracción de las proteínas a partir de las muestras de carne, se partió de 50 mg de muestra liofilizada. La muestra liofilizada se resuspendió en 1,5 mL de tampón de lisis, compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M, 4% de ácido α -Ciano-4-hidroxicinámico (CHAPS), ditioneitol (DTT) 10 mM y 2% de Farmalitos (pH 3-10) (GE Healthcare, Uppsala); y se incubaron durante dos horas a 25°C. Posteriormente, se lisaron 250 μ L de esta muestra usando

un sonicador S-250A (Branson, Danbury). Para evitar el calentamiento excesivo de la muestra a lo largo del proceso de lisado, ésta se mantuvo en un baño de agua helada. Con el objetivo de purificar la proteína, a partir del lisado de células, se usó el kit Clean-Up (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas purificadas se resuspendieron nuevamente en 250 μ L de tampón de lisis.

3.4. CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo tras cada proceso de extracción. Para ello, se usó el kit de ensayo de proteínas CB-X (G-Biosciences, St. Louis) siguiendo las indicaciones del fabricante para el uso de un lector de microplacas. El CB-X es un ensayo Bradford mejorado (Bradford 1976). Este método permite establecer una relación entre el máximo de absorbancia (465 a 595 nm) de una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules), con la cantidad de proteínas presentes en la disolución. Además, permite obtener una estimación rápida de la concentración de proteínas y es compatible con los métodos comúnmente utilizados para el aislamiento de proteínas. Para hallar la curva de calibración se usó como estándar proteico la albúmina de suero bovino (BSA).

3.5. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional (2-DE) se llevó a cabo siguiendo una modificación del protocolo publicado por Görg *et al.* (2000). Para el isoelectroenfoque (IEF) se partió de 350 μ g de la muestra disuelta en el tampón de lisis. A continuación, la muestra se disolvió nuevamente en un tampón de rehidratación, compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M, 4% de CHAPS y 0,002% de azul de bromofenol. Posteriormente se añadieron 0,6% de DTT y un 1% de buffer de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 4-7. Las muestras se cargaron en tiras IPG ReadyStripsTM IPG Strips (Bio-Rad Laboratories), de 24 cm de longitud y gradiente de pH lineal de 4-7. Para el IEF se utilizó un aparato programable de electroforesis horizontal PROTEAN[®] IEF Cell (Bio-Rad Laboratories). El primer paso fue la rehidratación de las tiras durante 12 h a 50 V. Seguidamente, se aumentó el voltaje de forma sucesiva, por intervalos, hasta alcanzar un voltaje total de 70 kVh.

Una vez terminado el IEF y previo a la segunda dimensión, las tiras se rehidrataron durante 30 minutos en dos disoluciones de rehidratación, a temperatura ambiente. La solución

I estaba compuesta por Tris 50 mM pH 8,8, urea 6 M, 2% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 30% de glicerol y 1% de DTT. La solución II estaba compuesta por Tris 50 mM pH 8,8, urea 6 M, 2% de SDS, 30% de glicerol y 4% de iodoacetamida. Las tiras se incubaron durante un período de 15 minutos en cada disolución.

La segunda dimensión se realizó usando un sistema vertical de electroforesis Ettan DALTsix (GE Healthcare). Se utilizaron geles de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) del 12% (w/v) de 25,5 cm x 20,5 cm x 1,0 mm (longitud x anchura x espesor), en un tampón del electrodo Tris-glicina-SDS (Tris 50 mM, glicina 384 mM y 0,2% de SDS). Como agente entrecruzador se utilizó la N'N'-bis-metilacrilamida. Como agentes aceleradores se utilizaron persulfato amónico (PSA), 0,001% (p/v) y N'N'N'N'-tetra-metil-etilendiamina (TEMED) a 0,001% (v/v). La segunda dimensión se desarrolló a una temperatura controlada de 25°C, mediante un sistema de refrigeración Frigiterm S-382 (JP Selecta); y a una corriente constante de 5 mA/ gel durante la primera hora, 10 mA/ gel la segunda, y una corriente de 16 mA/ gel durante las siguientes horas, por medio de una fuente de alimentación Power Pac 1000 (Bio-Rad Laboratories). En la segunda dimensión se usaron dos tampones, uno para el cátodo, compuesto por 10 mM Tris, 76,8 mM Glicina y 0,04% de SDS; y otro para el ánodo 5 mM Tris, 38,4 mM Glicina y 0,02% de SDS.

3.6. TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON PRO-Q DIAMOND

Para la detección de polipéptidos fosforilados en los geles de 2-DE, se usó el tinte específico para fosfoproteínas Pro-Q Diamond (Pro-Q DPS, Molecular Probes, Leiden), de acuerdo con el protocolo descrito en Agrawal & Thelen (2005) con ligeras modificaciones (López-Pedrouso *et al.* 2014). Primero, los geles se sometieron a un proceso de fijación mediante dos lavados de 30 minutos cada uno con una solución de fijación (50% de metanol y 10% de ácido acético). Posteriormente, los geles se lavaron con agua destilada, dos veces, durante 15 minutos cada lavado. A continuación, los geles de 2-DE se incubaron en una dilución acuosa de Pro-Q Diamond durante 2 h. Para eliminar el Pro-Q DPS no unido específicamente a las fosfoproteínas, los geles se lavaron con una solución de desteñido [50 mM acetato de sodio y 20% de acetonitrilo (ACN) pH 4,0] mediante cuatro lavados de 30 minutos cada uno. Por último, los geles de 2-DE se lavaron nuevamente con agua destilada, dos veces, durante 5 minutos cada una. Para validar la especificidad de reconocimiento de fosfoproteínas del Pro-Q DPS, bajo nuestras condiciones experimentales, se añadió el

marcador de fosfoproteínas PeppermintStick™ (Molecular Probes) a los extractos proteicos, previamente a la 2-DE.

3.7. TINCIÓN DE PROTEÍNAS CON SYPRO® RUBY

Para detectar la densidad total de todas las proteínas presentes, tanto los geles teñidos previamente con Pro-Q DPS como los que no, se tiñeron con el tinte fluorescente SYPRO® Ruby (Lonza, Rockland). Los geles no teñidos previamente con Pro-Q DPS, se sometieron a un proceso de fijación con una solución de fijación compuesta por 40% de etanol y 10% de ácido acético, durante un período mínimo de 3 h. Seguidamente, se lavaron con agua destilada, tres veces, 30 minutos cada vez. Posteriormente, se añadió el SYPRO® Ruby y se dejó en oscuridad durante toda la noche. De la misma manera, los geles previamente teñidos con Pro-Q DPS también se incubaron con SYPRO® Ruby durante toda la noche. A continuación, en ambos casos, los geles se lavaron tres veces con agua destilada, durante 30 minutos cada una, en oscuridad.

3.8. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Para la obtención de imágenes digitalizadas tanto de los geles teñidos para la proteína total (SYPRO® Ruby) como para la detección de fosfoproteínas (Pro-Q DPS), se utilizó el Gel Doc XR+ system (Bio-Rad Laboratories). Las imágenes digitalizadas se analizaron mediante el software PDQuest v. 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories). Los geles se compararon por réplicas biológicas, así como por parejas formadas por la imagen de cada gel teñido con Pro-Q DPS y con SYPRO® Ruby. Se llevó a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo del volumen de cada spot, previa normalización y eliminación del ruido de fondo. El análisis automático de los spots de proteína llevado a cabo por el software PDQuest se validó de manera manual. Únicamente se consideraron reproducibles los spots de proteína presentes en dos o más réplicas biológicas.

El punto isoeléctrico (pI) y la masa molecular (M_r) de cada spot se determinaron mediante el software PDQuest, teniendo en cuenta la posición de cada spot en las tiras IPG y su posición en el gel relativa al marcador de peso molecular (Fermentas, Ontairo), con un rango de 15 a 200 kDa.

3.9. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS: LC-MS/MS Y MALDI TOF/TOF

La identificación de los *spots* de interés se llevó a cabo mediante espectrometría de masas (MS). Para ello, se extrajo la región más intensamente teñida del centro de cada *spot* de proteína del gel, tratando de abarcar el mayor radio de proteína posible pero evitando recoger un exceso de matriz de gel. La digestión de los *spots* de proteína se llevó a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito por Jensen *et al.* (1999). Los *spots* de interés extraídos del gel se cortaron en pedazos y se lavaron con agua Mili-Q. Seguidamente, se deshidrataron mediante ACN y se secaron en una centrífuga de vacío. Las proteínas inmersas en la matriz de gel se sometieron a una digestión con tripsina, 1 µg/mL (Promega, Madison), en 50 mM de bicarbonato de amonio a pH 8, en un volumen total de 30 µL, a 37°C, durante toda la noche.

Para el análisis mediante LC-MS/MS, los fragmentos peptídicos producto de la digestión con tripsina se acidificaron con ácido acético. A continuación, se purificaron en una columna MicroSpin C18 (The Nest Group, South-borough). El análisis por LC-MS/MS se llevó a cabo mediante un Agilent 1260 HPLC series system (Agilent Technologies, Santa Clara) asociado a un espectrómetro de masas LIT-Velos (Thermo Fisher, San Jose). Para la separación de los péptidos se utilizó una columna BioBasic.18 RP (0,18 mm x 150 mm) (ThermoHypersil-Keystone, Bellefonte), usando 0,15% de ácido acético en agua Mili-Q como fase móvil A y ACN al 98% y ácido acético al 0,15% como fase móvil B. Se programó un gradiente lineal de la fase móvil B 5-40% en 90 min, manteniéndose el flujo a 1,5 µL/min. El voltaje para generar el aerosol fue de 3,5 kV y el flujo de N₂ de 8 unidades arbitrarias. La temperatura del capilar fue de 230°C. La detección de los iones peptídicos se realizó en modo positivo, de 400 a 1600 u.m.a. (dos microescáneres), seguido por cuatros escáneres MS/MS dato-dependientes (dos microescáneres). Para ello se usó un ancho de aislamiento de 3 u.m.a. y una energía de colisión normalizada del 35%. Después del segundo proceso de fragmentación, las masas fragmentadas se sometieron a exclusión dinámica durante 2 min y los iones cargados individualmente se excluyeron del análisis MS/MS. Se utilizó el motor de búsqueda SEQUEST (Proteome Discoverer 1.4 package, Thermo Fisher) para contrastar los espectros de MS/MS obtenidos con la base de datos de *B. taurus* de UniProt/SwissProt. Para ello, se fijaron en los parámetros básicos un número de sitios de restricción fallidos aceptados de 2, y en los parámetros avanzados, unas tolerancias de 1,2 Da y 0,5 Da para los iones precursores y los fragmentos de iones de MS/MS, respectivamente. Por otro lado, la oxidación de la

metionina, la carbamidometilación de la cisteína y la acetilación del extremo N-terminal de las proteínas, se establecieron como modificaciones variables permitidas. Finalmente, los resultados de la búsqueda en la base de datos se sometieron a un análisis estadístico mediante el Protein Discoverer Peptide Confidence (v.4.0), estableciendo un límite de *False Discovery Rate* (FDR) del 1-5%.

Ulterior al análisis por LC-MS/MS, se llevó a cabo un análisis por MALDI TOF/TOF con el objetivo de verificar las identificaciones de proteínas obtenidas anteriormente. Para el análisis mediante MALDI TOF/TOF, las muestras se prepararon mediante la reducción de las proteínas embebidas en los pedazos de gel mediante DTT 10 mM (Sigma-Aldrich, San Luis) en 50 mM de bicarbonato de amonio y la posterior alquilación de las mismas mediante 55 mM de iodoacetamida (sigma-Aldrich) en 50 mM de bicarbonato de amonio. A continuación, se llevó a cabo un lavado de las muestras con 50 mM de bicarbonato de amonio en 50% de metanol (HPLC grade, Scharlau, Barcelona), seguido de una deshidratación mediante la adición de ACN (HPLC grade, Scharlau) y, por último, un secado mediante un concentrador centrífugo con vacío SpeedVac (Thermo Fisher). Una vez secos, a los pedazos de gel con los spots de interés embebidos se les añadió tripsina porcina modificada (Promega) en una concentración final de 20 ng/ μ L en 20 mM de bicarbonato de amonio y se incubaron durante 16 h a 37°C. Finalmente, se procedió a la extracción de los péptidos de la matriz de gel mediante tres incubaciones en 40 μ L de 60% ACN en 0,5% HCOOH, de 20 minutos cada una. Los extractos peptídicos resultantes se agruparon y concentraron mediante un SpeedVac (Thermo Fisher) y se almacenaron a - 20°C. A la hora de realizar el análisis, las muestras secas se disolvieron en 4 μ L de HCOOH al 0,5%. A continuación, se mezclaron con 0,5 μ L de solución matriz [3 mg ácido ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), 1 mL de ACN al 50%, y 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA)], y se depositó la mezcla en una placa 382 Opti-TOF MALDI (Applied Biosystems, Foster City), usando el procedimiento de capa fina (Vorm *et al.* 1994). Los datos de MS se obtuvieron usando un analizador 4800 MADI-TOF/TOF (Applied Biosystems). Los espectros de MS se obtuvieron operando en modo reflectón, extracción retardada e ion-positivo. Se usó un láser Nd:YAG con longitud de onda fijada en 355 nm y se promediaron 1000 disparos de láser. Para la calibración interna de los espectros se utilizaron los picos resultantes de al menos tres autodigestiones de tripsina. La fragmentación de los iones precursores seleccionados se detectó con una resolución relativa de 300 (FWHM) y supresión meta estable. Los espectros de MS obtenidos se analizaron

mediante el software 4000 Series Explorer Software v. 3.5 (Applied Biosystems). Se hizo una búsqueda combinada (PMF y MS/MS) mediante el software GPS Explorer Software v. 3.6 usando el Mascot software v. 2.1. (Matrix Science, Boston) para cotejar con la base de datos *B. taurus* UniProt/SwissProt. Los parámetros de búsqueda establecidos fueron: tolerancia de un sitio de corte de la tripsina fallido, tolerancia de la masa del precursor de 30 ppm, tolerancia de la masa del fragmento de 0,35 Da, como modificación variable oxidación de la metionina y como modificación fija carbamidometilación de la cisteína.

Los *scores* de las proteínas con un valor mayor a 56 se aceptaron como estadísticamente significativos ($P < 0,05$), y las identificaciones de las proteínas se aceptaron como positivas cuando el intervalo de confianza del *score* era superior al 98%. En cuanto a los espectros MS/MS, el intervalo de confianza del *score* del ion se rebajó al 95%.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar los cambios cuantitativos y cualitativos en el volumen de cada *spot* de proteína, de control a DFD, se usó la medida denominada *fold change* (*FC*), definida como

$$FC = V_{DFD}/V_C$$

donde V_{DFD} es el volumen medio de cada *spot* en muestras DFD y V_C es el volumen medio de cada *spot* en muestras control. El rango de *FC* oscila entre $-\infty$ a $+\infty$, ya que los valores de *FC* menores que uno se sustituyen por su recíproco negativo. Además del *FC*, la variación de volumen de los *spots*, de control a DFD, también se calculó con la nueva medida de cambio relativo (*relative change*, *RC*), propuesta por primera vez en el presente trabajo. Esta medida viene dada por

$$RC = DV/|DV_{max}|$$

donde $DV = V_{DFD} - V_C$ es la diferencia de volumen de cada *spot* entre las muestras control y DFD, y DV_{max} es el mayor valor de *DV* en el estudio. La ventaja de esta nueva medida es que su rango oscila entre -1 y 1, y tiene un valor de 0 cuando no hay diferencias de volumen entre los *spots*.

Para determinar los cambios en el grado de fosforilación, se calculó la ratio de fosforilación (*phosphorylation rate*, *PR*) de cada proteína, dado por

$$PR = P/T$$

donde P es el volumen del *spot* teñido con Pro-Q DPS y T el volumen del mismo, teñido con SYPRO[®] Ruby (Huang *et al.* 2012). A continuación, se usó de nuevo la medida FC , que en este caso se define como

$$FC = PR_{DFD}/PR_C$$

donde PR_{DFD} es la media de los valores PR de un *spot* dado en las réplicas DFD y PR_C , la media de valores de PR de un *spot* en las réplicas control. Además, también se aplicó la medida RC para calcular el cambio relativo del nivel de fosforilación de cada *spot* de proteína entre las muestras DFD y control. En este caso, RC viene dada por

$$RC = DPR/(DPR_{max})$$

donde $DPR = PR_{DFD} - PR_C$ es la diferencia entre el PR de un *spot* entre los dos tipos de muestras, y DPR_{max} es el valor más alto de DPR observado en el estudio.

El análisis estadístico de las diferencias cuantitativas de los volúmenes y en el nivel de fosforilación de los *spots* entre los tipos de muestra, se llevó a cabo mediante el método *bootstrap*. Se usó el método *bootstrap* ya que ofrece claras ventajas frente a los test usados normalmente en este caso, como son el test de la t de Student y el test U de Mann-Whitney (Maltin *et al.* 2003; Sokal & Rohlf 2012). El test t se basa en una distribución t , en el caso de tamaños de muestra pequeños; o en una distribución normal, en el caso de tamaños muestrales grandes. Ambas distribuciones son paramétricas y teóricas y generalmente solo son aproximaciones a los datos de la muestra. En el caso del test de Mann-Whitney, aun siendo un test no paramétrico, no puede estimar la magnitud de las diferencias debido a que los datos observados son sustituidos por sus rangos. En contraste, el algoritmo *bootstrap* utiliza la distribución empírica de la media muestral.

En este caso, el elevado sesgo en las distribuciones de los volúmenes de los *spots* 2-DE de proteínas, ejercen un marcado efecto negativo sobre la eficiencia de los test t de Student y U de Mann-Whitney. En la Tabla 1 se muestra, como ejemplo, el sesgo del volumen medio ($\times 10^{-2}$), calculado a partir de las distintas réplicas biológicas, de cada *spot* 2-DE de proteína que presentó diferencias estadísticamente significativas en el volumen, entre muestras control y DFD. El sesgo de cada *spot* de proteína se calcula como el porcentaje de las 2000 réplicas

bootstrap de la media que presenta un volumen menor que el volumen medio observado, que se desvía del porcentaje esperado del 50% en las distribuciones no sesgadas. Como se puede ver, las distribuciones empíricas de los volúmenes medios están altamente sesgadas en la mayoría de las proteínas con diferencias en volumen en respuesta al PSS, con sesgos de hasta el 50% (Tabla 1). La distribución muestral de las medias de las muestras aleatorias de cualquier distribución, se aproxima a una distribución normal cuando el tamaño muestral es lo suficientemente grande, de acuerdo con el teorema del límite central (Sokal & Rohlf 2012). El problema es que los estudios proteómicos utilizan, normalmente, un bajo número de réplicas.

Tabla 1. Sesgos de los volúmenes medios de los *spots* de proteína con diferencias en el volumen entre muestras de carne control y DFD. Fuente: Franco *et al.* 2015b

Protein (Abbrev.)	Control meat		DFD meat	
	Mean volume (\pm SE, standard error)	Bias (%)	Mean volume (\pm SE, standard error)	Bias (%)
MYL3	2.16 \pm 0.46	0.6	0.00	N/A
MYL6B	13.6 \pm 8.41	17.2	2.40 \pm 0.71	10.6
MYL2	18.7 \pm 3.24	6.2	7.81 \pm 1.83	9.4
TNNC2	2.27 \pm 0.94	8.0	0.00	N/A
ST6GAL1	0.28 \pm 0.28	49.2	5.60 \pm 3.31	51.0
ATP5B	0.62 \pm 0.19	11.2	2.35 \pm 0.49	7.6
TPI1	3.03 \pm 0.12	6.0	6.83 \pm 2.61	10.2
CFL2	0.00	N/A	4.72 \pm 1.34	11.4
MYLPF	0.00	N/A	18.1 \pm 6.15	1.0
MYLPF-1	0.00	N/A	38.1 \pm 14.5	4.6

Para la obtención de los intervalos de confianza *bootstrap* no paramétricos para los volúmenes medios, así como de los valores medios del *PR*, de los *spots* observados en las muestras DFD y control, se usó el método de percentiles con corrección del sesgo (Efron 1982). Este método se llevó a cabo mediante el software DIANA (Zapata C, no publicado) para el análisis de datos de genética de poblaciones, escrito en Visual Basic. El software

DIANA utiliza números aleatorios para generar la distribución empírica *bootstrap* de las medias muestrales. Para cada conjunto de N (=4) estimas del volumen de cada *spot*, se obtuvieron 2000 réplicas *bootstrap* de tamaño N mediante un algoritmo Monte Carlo. A partir de la distribución de las 2000 réplicas *bootstrap* de las medias, se establecieron los intervalos de confianza. La corrección del sesgo se hizo a partir de la proporción de réplicas *bootstrap* de la media con un valor inferior a la estima observada de la media, usando la distribución normal teórica (Efron 1982). Para cada media de *PR* observada, se obtuvieron 20.000 réplicas *bootstrap* de tamaño N = 4, usando el generador de números aleatorios de Schrage (1979). En este caso, el error tipo I ($\alpha = 0,05$) se corrigió mediante el ajuste de Bonferroni.

Para realizar los test estadísticos estándar (U de Mann-Whitney, test de correlación de Spearman, etc.), se usó el software estadístico IBM SPSS Statistics 20 (SPSS, Chicago).

3.11. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Los identificadores GO (Gene Ontology) y los términos GO (proceso, función y componente), asignados mediante métodos de anotación manuales o automáticos (IEA, Inferred from Electronic Annotation), se obtuvieron por medio del navegador QuickGO (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>; European Bioinformatics Institute). La distribución de las tres ontologías (función molecular, componente celular y función biológica) de las proteínas con diferencias cuantitativas y en el grado de fosforilación entre muestras DFD y muestras control, se obtuvieron mediante la herramienta GO Slimmer de AmiGO (<http://amigo1.geneontology.org/cgi-bin/amigo/slimmer>).

El enriquecimiento de los términos GO se llevó a cabo mediante FatiGO (Al-Shahrour *et al.* 2004), herramienta de análisis funcional de Babelomics 4 (<http://v4.babelomics.org>), el cual compara el grupo de genes de interés con el resto del genoma (*B. taurus*), en diferentes bases de datos (GO biological process, GO molecular function, GO celular component, InterPro y KEGG). FatiGO utiliza el test Fisher de dos colas ($P < 0,05$) para detectar aquellos términos GO relevantes.

Las interacciones funcionales entre las proteínas identificadas y otras proteínas de *B. taurus* se analizaron utilizando el software STRING v9.1 y STRING v10.5 (Franceschini *et al.* 2013).

3.12. ANÁLISIS DE CLÚSTER

Se usaron análisis de clúster jerárquico aglomerativo UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averaging*) para agrupar, por un lado, las proteínas que mostraron un cambio significativo en el volumen y, por otro, las proteínas que mostraron cambios significativos en el nivel de fosforilación, entre carne control y DFD. Las proteínas se agruparon a partir de los datos en valor absoluto, obtenidos de matrices de distancias entre pares de valores *RC*. Para generar los dendrogramas UPGMA se utilizó el software NTSYSpc v.2.1 (Applied Biostatistics, Setauket).





RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1. CLASIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CARNE CONTROL Y DFD

La clasificación de las muestras control y DFD se llevó a cabo mediante la evaluación de los siguientes parámetros de calidad de la carne: pH, color (L^* , a^* y b^*), capacidad de retención de agua (WHC) y textura (fuerza de corte y dureza). Los valores medios (\pm SE, error estándar) de cada uno de los parámetros estimados en las muestras control y DFD se muestran en la Tabla 2 y se representan gráficamente en la Fig. 6. El test de una cola U de Mann-Whitney reveló diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para los parámetros de pH, color y luminosidad (b^* y L^*), WHC y los test de textura (test de Warner-Bratzler y TPA).

Tabla 2. Valores medios (\pm SE) de los parámetros de calidad de la carne (pH, color, capacidad de retención de agua y parámetros texturales) en muestras control (no-DFD) y DFD del músculo *longissimus thoracis* de bovino. Fuente: Franco *et al.* 2015a

Parameters	Control ^a	DFD ^a	P-value ^b
pH	5.61 \pm 0.01	6.37 \pm 0.13	0.01
Colour:			
Luminosity (L^*)	41.8 \pm 1.61	35.8 \pm 1.37	0.01
Redness (a^*)	13.4 \pm 0.63	9.62 \pm 1.73	0.07
Yellowness (b^*)	14.8 \pm 0.29	8.01 \pm 0.71	0.01
Water holding capacity:			
Cooking loss (%)	22.7 \pm 3.50	12.2 \pm 1.02	0.01
Textural / WB-test:			
Shear force (kg cm ⁻²)	3.31 \pm 0.42	1.89 \pm 0.64	0.02
Textural / TPA-test:			
Hardness (kg)	5.93 \pm 0.61	4.94 \pm 0.34	0.02

^a Los datos son medias (\pm SE) de cuatro réplicas biológicas; ^b P-valor, valor de probabilidad por el test de una cola U de Mann-Whitney.

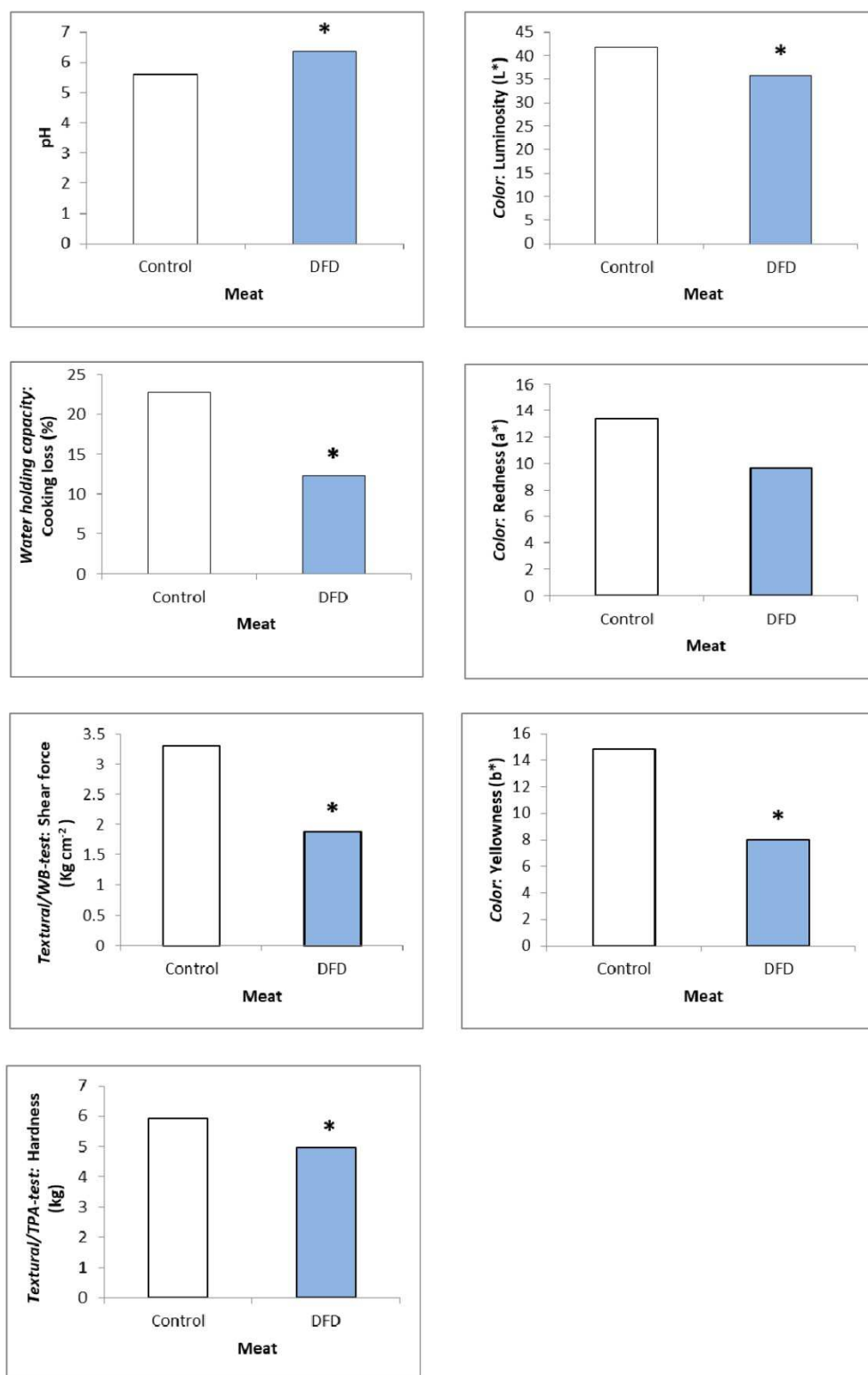


Fig. 6. Valores medios de los parámetros de calidad de la carne (pH, color, capacidad de retención de agua y parámetros de textura) de las 4 réplicas biológicas de carne DFD y control, procedentes del músculo *longissimus thoracis* de bovino. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) mediante el test U de Mann-Whitney se indican con un asterisco. Fuente: Mato *et al.* 2019

Las muestras del estudio fueron previamente clasificadas como posibles muestras control y DFD por sus valores de pH. En efecto, todas las muestras de carne control mostraron valores de pH inferiores a 6,0 mientras que los valores de pH de las muestras DFD fueron siempre superiores a 6,0, como corresponde a ambos tipos de muestras. Las diferencias en los parámetros de calidad analizados también se ajustaron a los valores esperados para ambos tipos de carne y confirmaron su clasificación previa en función del pH. Primero, las muestras presuntamente de tipo DFD presentaron un color más oscuro que las control puesto que sus valores de color y luminosidad (b^* y L^*), medidos en el espacio CIELab, fueron inferiores. Segundo, la medida de pérdidas por cocción, para determinar la WHC, fue inferior en la carne categorizada previamente como DFD. Finalmente, las muestras inicialmente clasificadas como carne DFD presentaron una mayor terneza que las control a juzgar por los valores obtenidos en los test de textura. Además, se observó una relación negativa estadísticamente significativa entre L^* , b^* , la fuerza de corte y la dureza con el pH ($r_s = -0,98$, $n = 8$; $P < 0,01$ para L^* ; $r_s = -0,91$, $n = 8$; $P < 0,01$ para b^* ; $r_s = -0,93$, $n = 8$; $P < 0,01$ para la fuerza de corte; y $r_s = -0,73$, $n = 8$; $P < 0,01$ para la dureza), de acuerdo con estudios previos (Silva *et al.* 1999; Abril *et al.* 2001). Estos resultados nos permiten concluir que las muestras seleccionadas son auténticas muestras tipificadas como carne DFD y control (Abril *et al.* 2001; Muchenje *et al.* 2009; Adzitey & Nurul 2011). Por tanto, son un excelente material de partida para el estudio de los cambios en el proteoma y fosfoproteoma ligados al PSS.

4.2. PERFILES PROTEÓMICOS Y FOSFOPROTEÓMICOS EN MUESTRAS CONTROL Y DFD MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-DE)

En este estudio, se ha usado la electroforesis bidimensional (2-DE) para obtener los perfiles tanto del proteoma como del fosfoproteoma de las muestras de carne DFD y control, procedentes del músculo LT recogidas a las 24 h *post mortem*. La identificación de los spots, su emparejamiento entre geles y la medida de sus volúmenes se llevó a cabo mediante el software PDQuest.

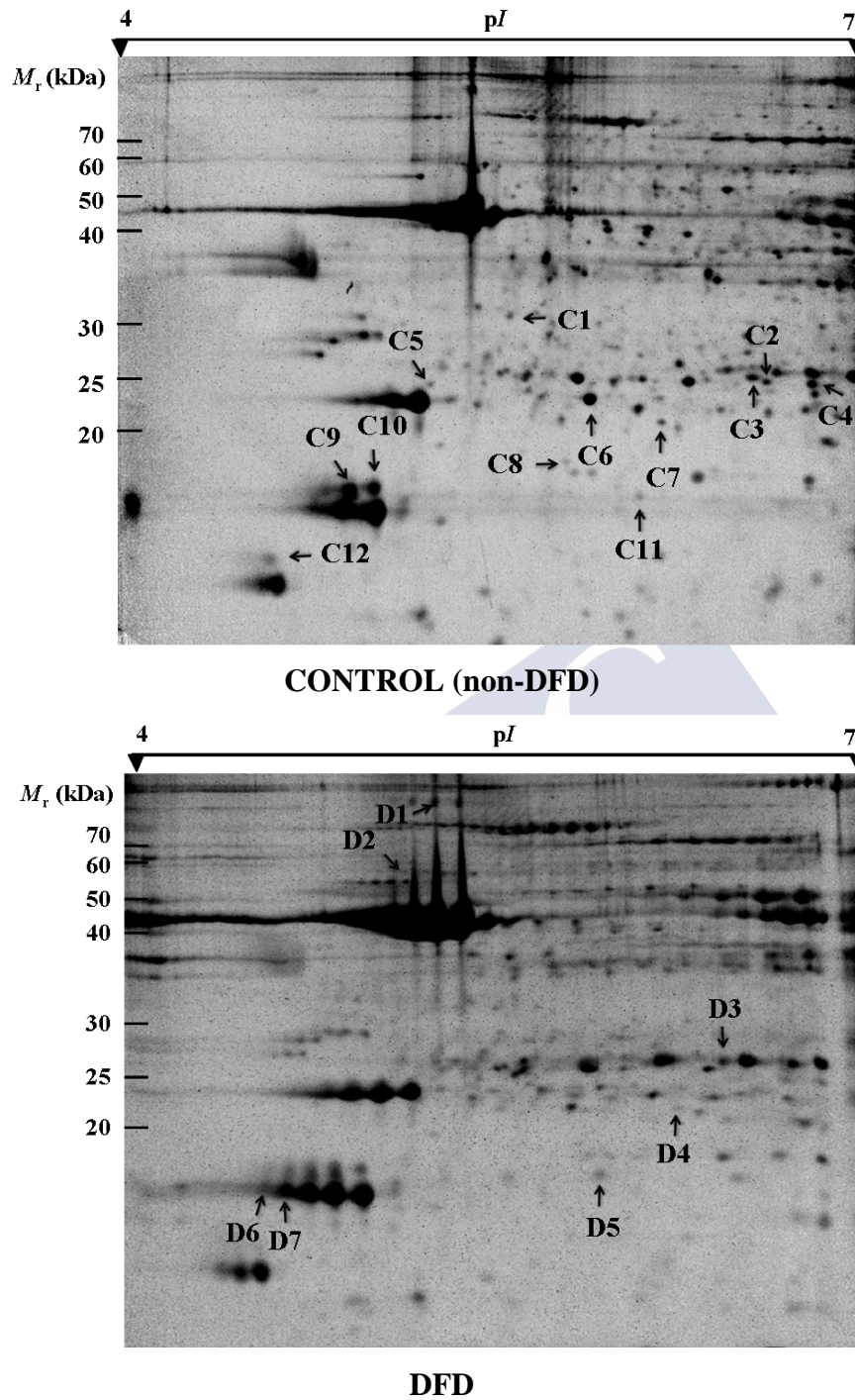


Fig. 7. Perfiles proteómicos representativos de las muestras de carne control (arriba) y DFD (abajo) procedentes del músculo LT de bovino en geles de 2-DE. Se señalan y numeran los *spots* de proteína con diferencias de volumen estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los dos grupos de muestra. Fuente: Franco *et al.* 2015a.

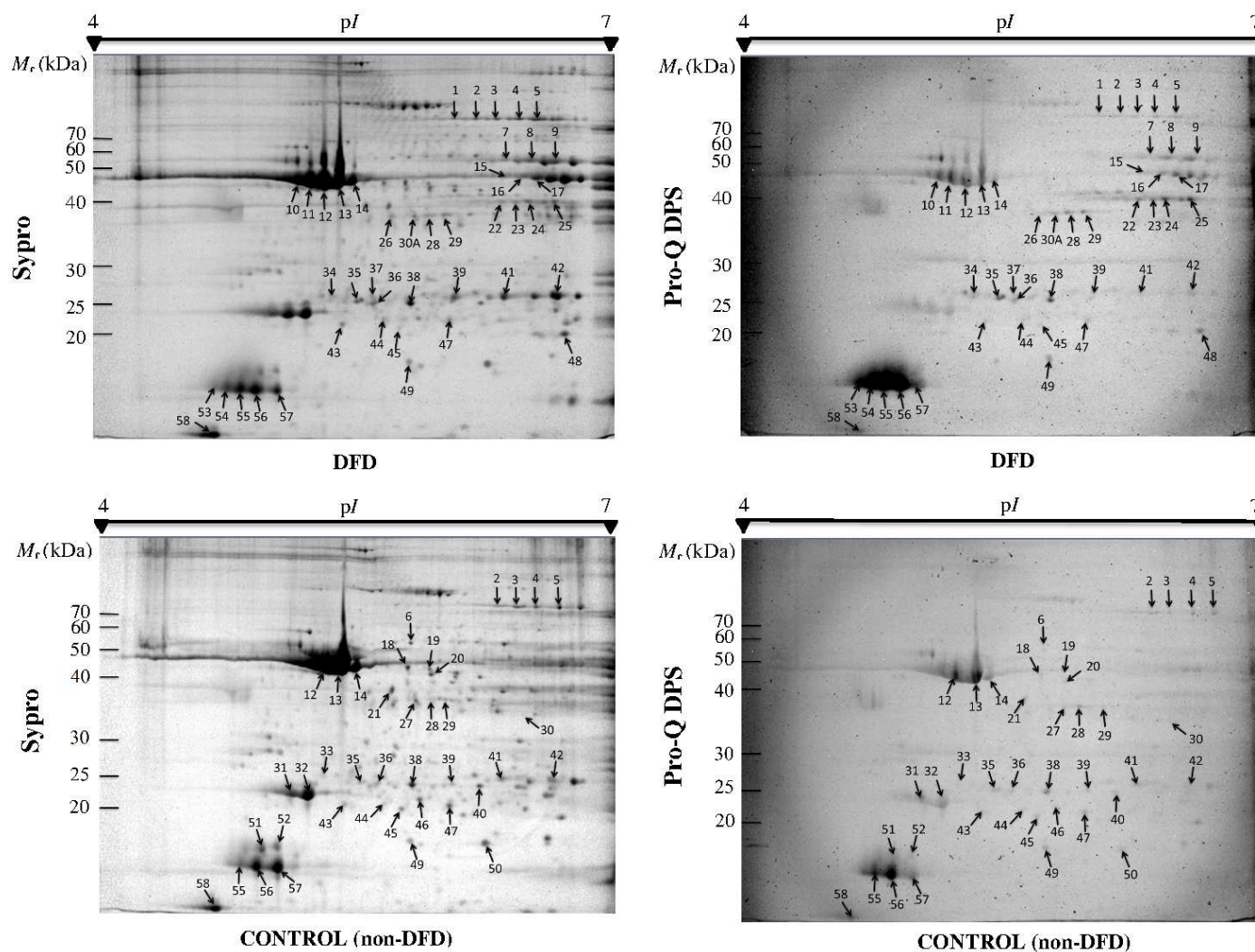


Fig. 8. Perfiles proteómicos representativos de las muestras de carne DFD (arriba) y control (abajo) procedentes del músculo LT de bovino, en geles de 2-DE teñidos con Pro-Q DPS (Dcha.) y SYPRO® Ruby (Izq.). Se numeran y señalan los *spots* de proteína con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los dos grupos de muestras. Fuente: Mato *et al.* 2019

4.2.1. Cambios en el proteoma global de las muestras de carne del músculo LT en respuesta al PSS

Se estudiaron los cambios cualitativos y cuantitativos del proteoma global de las muestras de carne del músculo LT en respuesta al PSS. En la Fig. 7 se muestran las imágenes de los perfiles representativos del proteoma de las muestras control y DFD, a las 24 h *post mortem*, en geles de 2-DE teñidos con la sal fluorescente SYPRO[®] Ruby. Los perfiles proteómicos obtenidos fueron de buena calidad y altamente reproducibles como resultado de los protocolos aplicados en el estudio para la extracción de proteínas y la 2-DE. Se establecieron diferencias estadísticamente significativas en el volumen promedio de los *spots* entre las muestras DFD y control mediante intervalos de confianza (CIs) *bootstrap* no paramétricos, obtenidos por el método de percentiles con corrección del sesgo y ajustados con el método de Bonferroni para comparaciones múltiples. En la Tabla 3 se muestran los valores medios (\pm SE) de los volúmenes ($\times 10^{-2}$) junto con sus CIs *bootstrap* (95 y 99%) solo para los *spots* proteicos con diferencias estadísticamente significativas entre las muestras control y DFD. Los resultados muestran que se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de muestras para un total de 19 *spots*. Las diferencias fueron tanto cualitativas (i.e. presencia/ausencia de un *spot* dado) como cuantitativas (i.e. diferencias en la intensidad de los *spots*). De los 19 *spots* proteicos con cambios significativos entre las muestras control y DFD, 12 estuvieron sobrerrepresentados en carne control (*spots* C1 a C12) y los 7 *spots* restantes (*spots* D1 a D7) en la carne DFD.

Tabla 3. Volumen medio ($\times 10^{-2}$) de los *spots* de proteína con diferencias ($P < 0.05$) en abundancia entre las muestras de carne control y DFD. Fuente: Franco *et al.* 2015a.

Spot code ^a	Control			DFD			<i>P</i> -value ^c
	Volume ^b	95% bootstrap CI (CL, CU) ^c	99% bootstrap CI (CL, CU) ^c	Volume ^b	95% bootstrap CI (CL, CU)	99% bootstrap CI (CL, CU)	
C1	4.55 \pm 0.96	3.25, 6.57	3.22, 7.30	1.76 \pm 0.43	0.93, 2.49	0.90, 2.49	< 0.01
C2	1.72 \pm 0.81	0.39, 3.30	0.19, 3.54	0.00	-	-	< 0.01
C3	7.15 \pm 1.81	4.93, 10.7	4.15, 12.1	0.00	-	-	< 0.01
C4	2.96 \pm 0.90	1.04, 4.36	0.99, 4.61	0.00	-	-	< 0.01
C5	2.16 \pm 0.46	1.33, 2.82	1.21, 3.01	0.00	-	-	< 0.01
C6	13.6 \pm 8.41	4.44, 30.8	4.38, 38.8	2.40 \pm 0.71	1.57, 3.77	1.56, 4.50	< 0.05
C7	3.48 \pm 0.82	2.37, 4.69	2.26, 4.80	0.00	-	-	< 0.01
C8	4.41 \pm 0.46	3.59, 5.09	3.13, 5.14	2.44 \pm 0.65	1.25, 3.34	0.62, 3.43	< 0.05
C9	18.7 \pm 3.24	14.1, 24.3	12.4, 24.4	7.81 \pm 1.83	5.67, 11.5	5.54, 11.6	< 0.01
C10	16.2 \pm 3.96	10.6, 24.6	10.5, 27.4	4.21 \pm 0.32	3.77, 4.87	3.67, 5.09	< 0.01

Tabla 3. Cont.

Spot code ^a	Control			DFD			P-value ^c
	Volume ^b	95% bootstrap CI (CL, CU) ^c	99% bootstrap CI (CL, CU) ^c	Volume ^b	95% bootstrap CI (CL, CU) ^c	99% bootstrap CI (CL, CU) ^c	
C11	2.27 ± 0.94	0.71, 4.12	0.62, 4.74	0.00	-	-	< 0.01
C12	5.01 ± 0.66	3.79, 5.91	3.63, 6.06	0.91 ± 0.70	0.10, 2.34	0.09, 2.99	< 0.01
D1	0.28 ± 0.28	0.00, 0.56	0.00, 0.56	5.60 ± 3.31	2.29, 8.90	2.29, 8.90	< 0.01
D2	0.62 ± 0.19	0.25, 0.87	0.06, 0.90	2.35 ± 0.49	1.67, 3.34	1.50, 3.66	< 0.01
D3	3.03 ± 0.12	2.80, 3.25	2.80, 3.25	6.83 ± 2.61	3.40, 12.3	2.93, 12.3	< 0.05
D4	0.00	-	-	1.64 ± 0.29	1.33, 2.23	1.30, 2.50	< 0.01
D5	0.00	-	-	4.72 ± 1.34	2.96, 7.53	2.71, 8.58	< 0.01
D6	0.00	-	-	18.1 ± 6.15	5.58, 26.0	5.58, 27.3	< 0.01
D7	0.00	-	-	38.1 ± 14.5	16.3, 59.9	8.11, 63.3	< 0.01

^a Numeración de los *spots* según la Fig. 7. ^b Volumen medio ± error estándar. ^c Intervalos de confianza (CIs) *bootstrap* no paramétricos (CL, límite inferior; CU, límite superior) obtenidos mediante el método de percentiles con corrección de sesgo y ajustados por el método Bonferroni.

4.2.2. Cambios en el fosfoproteoma global de las muestras de carne del músculo LT en respuesta al PSS

Los perfiles representativos del fosfoproteoma de las muestras de carne DFD (arriba) y control (abajo) procedentes del músculo LT bovino, en geles de 2-DE teñidos primeramente con la tinción específica de fosfoproteínas Pro-Q DPS (Dcha.) y posteriormente con SYPRO® Ruby (Izq.) se muestran en la Fig. 8. La unión específica del tinte Pro-Q DPS a las fosfoproteínas, bajo nuestras condiciones experimentales, se validó con PeppermintStick, compuesto por una mezcla de proteínas y fosfoproteínas que actúan como controles positivos (ovoalbúmina y β -caseína) y negativos (β -galactosidasa, sero-albúmina bovina, avidina y lisozima) de fosforilación.

El análisis de los geles reveló que de los 314 *spots* de proteína resueltos en los geles de muestras DFD, 46 se tiñeron con el tinte específico para fosfoproteínas Pro-Q DPS. En el caso de las muestras control, el número de *spots* teñidos con Pro-Q DPS fue de 41 de un total de 308 *spots*. Por tanto, el porcentaje de *spots* teñidos con Pro-Q DPS fue similar en ambos tipos de muestras: 14,6% en carne DFD y 13,3% en carne control ($P = 0,76$, test exacto de Fisher de dos colas). Además, cabe destacar que ambos tipos de muestras solamente compartieron 28 de los *spots* teñidos con Pro-Q DPS. Así, 18 y 13 de los *spots* de fosfoproteína detectados fueron *spots* únicos en muestras de carne DFD y control respectivamente. En total, se detectaron 59 *spots* conteniendo proteínas fosforiladas en ambos tipos de muestra.

La cuantificación de los niveles de fosforilación para cada uno de los 59 *spots* de proteína teñidos con Pro-Q DPS se estimó mediante el estadístico PR . La Tabla 4 muestra el valor medio de PR ($\pm SE$) en muestras control (PR_C) y DFD (PR_{DFD}) junto con los CIs *bootstrap* del 95%, ajustados con el método de Bonferroni. En total, 32 de los 59 (54,2%) *spots* identificados como fosforilados mediante la tinción Pro-Q DPS, mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en sus niveles de fosforilación entre los dos grupos de muestras. Cabe destacar que un 97% de estas diferencias (31 de 32 *spots*) se correspondieron con *spots* únicos en las muestras de carne control o DFD. Además, el PR_{DFD} medio ($\pm SE$) resultó ser significativamente mayor que el PR_C medio ($\pm SE$): $0,33 \pm 0,06$ y $0,13 \pm 0,03$, respectivamente ($P < 0,05$, test de dos colas de Mann-Whitney). Estos resultados muestran un incremento pronunciado de los niveles de fosforilación, en respuesta al PSS.

Tabla 4. Spots de proteína con cambios estadísticamente significativos ($P < 0,05$) en el estatus de fosforilación entre las muestras de carne DFD y control (no-DFD) del músculo LT de bovino. Fuente: Mato *et al.* 2019

Spot no. ^a	PR_{DFD}		PR_C	
	Mean (\pm SE)	Adjusted 95% CIs (CL, CU) ^b	Mean (\pm SE)	Adjusted 95% CIs (CL, CU)
1	0.41 \pm 0.10	0.292, 0.603	0	N/A
5	0.08 \pm 0.03	0.051, 0.108	0.36 \pm 0.12	0.169, 0.696
6	0	N/A	0.12 \pm 0.06	0.060, 0.171
7	0.54 \pm 0.21	0.206, 0.939	0	N/A
8	0.48 \pm 0.08	0.281, 0.614	0	N/A
9	0.36 \pm 0.10	0.153, 0.630	0	N/A
10	0.33 \pm 0.06	0.205, 0.435	0	N/A
11	0.31 \pm 0.03	0.238, 0.371	0	N/A
15	0.35 \pm 0.16	0.154, 0.655	0	N/A
16	0.31 \pm 0.04	0.237, 0.379	0	N/A
18	0	N/A	0.12 \pm 0.04	0.067, 0.186
19	0	N/A	0.15 \pm 0.05	0.041, 0.206
20	0	N/A	0.13 \pm 0.02	0.105, 0.179
21	0	N/A	0.11 \pm 0.05	0.031, 0.187
22	0.70 \pm 0.12	0.458, 0.948	0	N/A
23	0.69 \pm 0.08	0.505, 0.874	0	N/A
24	0.66 \pm 0.10	0.452, 0.804	0	N/A
25	0.63 \pm 0.06	0.447, 0.693	0	N/A
26	0.72 \pm 0.19	0.531, 0.904	0	N/A
27	0	N/A	0.37 \pm 0.19	0.175, 0.563
30	0	N/A	0.73 \pm 0.19	0.358, 0.929
30A	0.71 \pm 0.15	0.402, 0.879	0	N/A
33	0	N/A	0.49 \pm 0.24	0.033, 0.839
34	0.69 \pm 0.25	0.192, 0.951	0	N/A
37	0.65 \pm 0.19	0.467, 0.835	0	N/A

Tabla 4. Cont.

Spot no. ^a	PR_{DFD}		PR_C	
	Mean (\pm SE)	Adjusted 95% CIs (CL, CU) ^b	Mean (\pm SE)	Adjusted 95% CIs (CL, CU)
44	0	N/A	0.46 \pm 0.20	0.087, 0.776
46	0	N/A	0.13 \pm 0.03	0.073, 0.177
50	0	N/A	0.09 \pm 0.05	0.011, 0.194
51	0	N/A	0.38 \pm 0.14	0.211, 0.664
52	0	N/A	0.37 \pm 0.19	0.020, 0.764
53	0.93 \pm 0.05	0.831, 1.000	0	N/A
54	0.94 \pm 0.04	0.875, 1.000	0	N/A

^a Numeración de los *spots* según la Fig. 8. ^b Intervalos de confianza (CIs) *bootstrap* no paramétricos (CL, límite inferior; CU, límite superior) obtenidos mediante el método de percentiles con corrección de sesgo y ajustados por el método Bonferroni.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las proteínas que presentaron diferencias estadísticamente significativas tanto en el volumen como en sus niveles de fosforilación, en respuesta al PSS, se identificaron mediante espectrometría de masas. Las proteínas con diferencias en volumen entre muestras DFD y control, se identificaron por LC-MS/MS (Tabla 5) y se confirmaron mediante el análisis por MALDI-TOF/TOF MS (Anexo I). En el caso de las proteínas con diferencias en el estatus de fosforilación entre carne control y DFD, la identificación se llevó a cabo por MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS (Tabla 6 y Anexo II).

En ambos casos, las identificaciones de las proteínas se validaron a través de la concordancia entre la M_r y el pI observados y teóricos, y comprobando la consistencia con identificaciones previas ya publicadas, utilizando 2-DE y MS, en el músculo LT bovino (Bouley *et al.* 2004; Laville *et al.* 2009).

Tabla 5. Identificación mediante LC-MS/MS de los *spots* de proteína 2-DE con diferencias de volumen estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre la muestras de carne control y DFD. Fuente: Franco *et al.* 2015a.

Spot code	M_r (kDa) Observed/ expected	pI Observed/ expected	Protein	Abbrev.	Accession No. (Uniprot)	Coverage (%)	No. of non- redundant peptides	Spectral counts
C1	29.2/89.4	5.30/8.83	AFG3-like protein 2	AFG3L2	Q2KJI7	7.95	6	15
C2	25.0/43.6	6.59/8.98	Chemokine binding protein 2	CCBP2	Q58CW9	15.36	5	12
C3	25.7/-	6.51/-	Uncharacterized protein				4	4
C4	23.5/-	6.97/-	Uncharacterized protein				5	5
C5	22.7/21.9	5.02/5.00	Myosin light chain 3	MYL3	P85100	43.21	4	11
C6	21.1/23.4	5.69/5.40	Myosin light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	MYL6B	Q148H2	17.06	3	76
C7	20.0/23.4	6.03/5.40	Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	MYL6B-1	Q148H2	24.64	5	10
C8	18.5/164.7	5.59/6.28	Carbamoyl-phosphate synthase	CPS1	F1ML89	3.20	4	9

Tabla 5. Cont.

Spot code	M _r (kDa) Observed/ expected	pI Observed/ expected	Protein	Abbrev.	Accession No. (Uniprot)	Coverage (%)	No. of non- redundant peptides	Spectral counts
C9	18.1/19.0	4.86/4.88	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	MYL2	F1ME15	52.94	9	221
C10	18.2/-	4.90/-	Uncharacterized protein				3	3
C11	17.8/18.2	5.91/4.06	Troponin C type 2, fast	TNNC2	G3MZK7	44.34	4	15
C12	16.3/19.0	4.70/4.83	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	MYL2-1	F1ME15	23.49	3	16
	16.3/164.7	4.70/6.28	Carbamoyl-phosphate synthase 1	CPS1	F1ML89	2.46	3	11
D1	86.7/28.4	5.04/9.84	Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1	ST6GAL1	Q2KIW7	20.47	4	18
D2	52.6/56.3	4.98/5.15	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	P00829	17.42	6	24
D3	26.1/26.7	6.25/6.45	Triosephosphate isomerase	TPI1	Q5E956	16.46	3	53
D4	20.0/22.9	6.03/12.2	LOC767890 protein	LOC767890	Q29RN5	19.16	4	7

Tabla 5. *Cont.*

Spot code	M_r (kDa) Observed/ expected	pI Observed/ expected	Protein	Abbrev.	Accession No. (Uniprot)	Coverage (%)	No. of non- redundant peptides	Spectral counts
D5	17.8/18.7	5.63/7.66	Cofilin-2	CFL2	Q148F1	26.50	4	11
D6	17.7/19.0	4.74/4.88	Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform	MYLPF	Q0P571	15.88	3	5
D7	17.6/19.0	4.77/4.88	Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform	MYLPF-1	Q0P571	34.12	4	18

La lista de *spots* de proteína identificados con diferencias de volumen entre carne control y DFD, seleccionadas para un análisis más detallado de la respuesta del proteoma al PSS, fue la siguiente: MYLPF, MYLPF-1, MYL3, MYL6B, MYL2, TNNC2, TPI1, CFL2, STGAL1 y ATP5B. Del total de proteínas identificadas, se eliminaron aquellas no caracterizadas en *B. taurus* (spots C3, C4 y C10). También se prescindió de la proteína identificada en el *spot* D4 al tratarse de una proteína hipotética (LOC767890). Finalmente, se eliminaron seis de las proteínas identificadas (spots C1, AFG3L2; C2, CCBP2; C7, MYL6B-1; C8, CPS1; C-12 MYL2-1; y C12, CPS1) por un posible fenómeno de fragmentación, dada la discrepancia entre la M_r teórica y la observada en los geles 2-DE. Este fenómeno es una consecuencia probable de la degradación proteica asociada con la muerte celular y el proceso de conversión del músculo en carne que comienza en el momento del sacrificio del animal (Taylor *et al.* 1995; Geesink & Koohmarie 1999; D'Alessandro & Zolla 2013). La capacidad de la 2-DE para detectar patrones proteicos degradados es una de sus ventajas en comparación con las técnicas proteómicas *gel free* (López-Pedrouso *et al.* 2018; 2019a, b).

En los 32 *spots* de fosfoproteína con diferencias en el nivel de fosforilación entre carne control y DFD, se identificaron un total de 13 proteínas no redundantes. Específicamente, la lista de fosfoproteínas identificadas que experimentaron respuesta al PSS fue la siguiente: ACTA1, MYLPF, MYL2, MYL6B, TNNT1, TNNT3, CAPZA2, PGM1, ENO3, CKM, UQCRC1, HSPB1 y HSPB6.

Tabla 6. Identificación de los *spots* 2-DE con diferencias en los niveles de fosforilación estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las muestras de carne control y DFD, mediante MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF MS. Fuente: Mato *et al.* 2019

Spot no. ^a	Type of meat	Protein identity ^b	Abbrev. (isospot)	Accession	M_r (kDa) Obs./Exp ^c	pI Obs./Exp ^c	Score ^d	Sequence coverage ^e
1	DFD	Phosphoglucomutase-1	PGM1 (1)	PGM1_BOVIN	66.2/61.8	5.90/6.36	415	45
5	DFD	Unidentified			69.9/61.8	6.98/6.36		
	Control	Phosphoglucomutase-1	PGM1 (2)	PGM1_BOVIN	69.9/61.8	6.98/6.36	552	41
6	Control	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1	QCR1_BOVIN	53.9/53.4	5.60/5.94	364	47
7	DFD	Beta-enolase	ENO3 (1)	ENOB_BOVIN	51.9/47.4	6.33/7.60	269	39
8	DFD	Beta-enolase	ENO3 (2)	ENOB_BOVIN	51.8/47.4	6.45/7.60	253	34
9	DFD	Beta-enolase	ENO3 (3)	ENOB_BOVIN	51.7/47.4	6.63/7.60	269	48
10	DFD	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1 (1)	ACTS_BOVIN	42.2/42.4	4.95/5.23	474	62
11	DFD	Actin, alpha 1, skeletal muscle	ACTA1 (2)	A4IFM8_BOVIN	41.6/42.4	4.99/5.23	439	51
15	DFD	Creatin kinase M-type	CKM (1)	KCRM_BOVIN	45.0/43.2	6.34/6.63	266	39
16	DFD	Creatin kinase M-type	CKM (2)	KCRM_BOVIN	44.1/43.1	6.42/6.63	369	49

Tabla 6. Cont.

Spot no. ^a	Type of meat	Protein identity ^b	Abbrev. (isospot)	Accession	<i>M_r</i> (kDa) Obs./Exp ^c	<i>pI</i> Obs./Exp ^c	Score ^d	Sequence coverage ^e
18	Control	Actin, alpha, skeletal muscle	ACTA1 (3)	ACTS_BOVIN	45.3/42.4	5.58/5.23	519	43
19	Control	Actin, alpha, skeletal muscle	ACTA1 (4)	ACTS_BOVIN	44.5/42.4	5.78/5.23	453	39
20	Control	Actin, alpha, skeletal muscle	ACTA1 (5)	ACTS_BOVIN	40.0/42.4	5.80/5.23	423	33
21	Control	Actin, alpha, skeletal muscle	ACTA1 (6)	ACTS_BOVIN	36.5/42.4	5.45/5.23	484	53
22	DFD	Troponin T, fast skeletal muscle	TNNT3 (1)	TNNT3_BOVIN	37.8/32.1	6.31/5.99	66	8
23	DFD	Troponin T fast skeletal muscle	TNNT3 (2)	TNNT3_BOVIN	37.8/32.1	6.38/5.59	62	13
24	DFD	Troponin T, fast skeletal muscle	TNNT3 (3)	TNNT3_BOVIN	37.8/32.1	6.44/5.99	145	13
25	DFD	Troponin T, fast skeletal muscle	TNNT3 (4)	TNNT3_BOVIN	37.8/32.1	6.62/5.99	60	13
26	DFD	F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAPZA2	CAZA2_BOVIN	35.4/33.1	5.48/5.57	74	16
27	Control	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1 (7)	ACTS_BOVIN	35.8/42.4	5.54/5.23	300	23

Tabla 6. Cont.

Spot no. ^a	Type of meat	Protein identity ^b	Abbrev. (isopot)	Accession	M _r (kDa) Obs./Exp ^c	pI Obs./Exp ^c	Score ^d	Sequence coverage ^e
30	Control	Troponin T, slow skeletal muscle	TNNT1 (1)	TNNT1_BOVIN	33.8/31.3	6.53/5.71	109	20
30A	DFD	Troponin T, slow skeletal muscle	TNNT1 (2)	TNNT1_BOVIN	35.5/31.3	5.63/5.71	71	14
33	Control	Heat shock protein beta-1	HSPB1 (1)	HSPB1_BOVIN	25.8/22.4	5.05/5.98	230	36
34	DFD	Heat shock protein beta-1	HSPB1 (2)	E1BEL7_BOVIN	26.2/22.6	5.09/5.77	159	20
37	DFD	Heat shock protein beta-1	HSPB1 (3)	E1BEL7_BOVIN	25.9/22.6	5.34/5.77	163	27
44	Control	Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	MYL6B (1)	Q148H2_BOVIN	20.9/23.5	5.43/5.40	109	26
46	Control	Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	MYL6B (2)	Q148H2_BOVIN	21.1/23.5	5.69/5.40	329	58
50	Control	Heat shock protein beta-6	HSPB6	HSPB6_BOVIN	18.7/17.5	6.28/5.95	146	39

Tabla 6. Cont.

Spot no. ^a	Type of meat	Protein identity ^b	Abbrev. (isospot)	Accession	M_r (kDa) Obs./Exp ^c	pI Obs./Exp ^c	Score ^d	Sequence coverage ^e
51	Control	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	MYL2 (1)	MLRV_BOVIN	18.1/18.9	4.86/4.86	399	65
52	Control	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	MYL2 (2)	F1ME15_BOVIN	18.2/18.9	4.90/4.86	380	76
53	DFD	Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform	MYLPF (1)	MLRS_BOVIN	17.7/19.1	4.74/4.91	363	61
54	DFD	Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform	MYLPF (2)	MLRS_BOVIN	17.6/19.1	4.77/4.91	88	23

^a Numeración de los *spots* según su posición en el gel asignada en Fig. 8. ^b Todas las proteínas identificadas coincidieron con proteínas de *Bos taurus*. ^c El punto isoeléctrico (pI) teórico (Th) y la masa molecular (M_r) se obtuvieron de las bases de datos UniProtKB/Swiss-Prot. El pI y la M_r observados (Ob) se obtuvieron a partir de la posición de cada *spot* en el gel. ^d El *score* mínimo estadísticamente significativo ($P < 0.05$) obtenido con Mascot fue de 56. ^e Porcentaje de correspondencia o *coverage* de los péptidos identificados sobre la secuencia de aminoácidos completa de la proteína correspondiente.

4.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS ASOCIADOS AL ESTRÉS PRE-SACRIFICIO (PSS) MEDIANTE LOS ESTADÍSTICOS *FC* Y *RC*

Tanto la variación en el volumen de los *spots* de proteína como la variación en la ratio de fosforilación (*PR*) de los mismos entre las muestras control y DFD, se calculó mediante los estadísticos “*fold change*” (*FC*) y “*relative change*” (*RC*). *FC* es usado comúnmente para estudiar los cambios cuantitativos entre grupos de muestra. Presenta un rango de valores que oscila entre $-\infty$ y $+\infty$. Cuando el cambio entre los grupos de muestra es cualitativo, *FC* proporciona valores de $-\infty/+\infty$, mientras que su valor es +1,0 cuando no hay variación entre muestras. Sin embargo, *RC* ofrece una información más clara que *FC* acerca de las diferencias en la intensidad de los *spots* de proteína o en su *PR*. Esto es así debido a que los valores de *RC* oscilan entre -1,0 y +1,0, dando valores de -1,0/+1,0 cuando el cambio es cualitativo, y de cero cuando la variación es nula entre grupos de muestras. Con la intención de ilustrar las diferencias en la información proporcionada por las medias *FC* y *RC*, la Fig. 9 muestra la variación en el volumen de las proteínas, entre muestras control y DFD, medida con uno u otro estadístico. Como se observa en la Fig. 9, y se refleja también en la Tabla 7, el estadístico *FC* da valores de $-\infty/+\infty$ para aquellas proteínas con cambios cualitativos en volumen, en respuesta al PSS, como por ejemplo MYL3, TNNC2 o las isoformas de MYLPP, cuando la ausencia de estos *spots* puede ser debida únicamente a que los niveles de estas proteínas sean indetectables en los geles de 2-DE. Sin embargo, la medida *RC* nos permite analizar los *spots* de proteína con cambios tanto cualitativos como cuantitativos entre los grupos de muestra, dentro del mismo rango de variación.

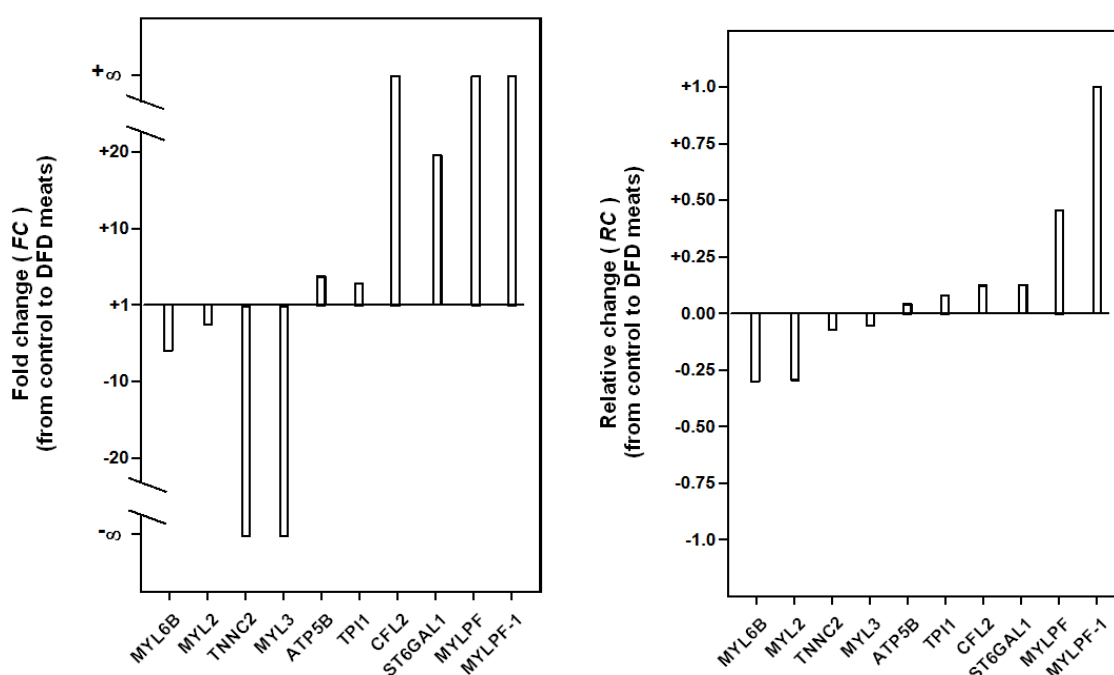


Fig. 9. Comparación del cambio de abundancia de los *spots* de proteína con diferencias significativas entre las muestras control y DFD del músculo LT de bovino, mediante los estadísticos *fold change* (FC) y *relative change* (RC). Fuente: Franco *et al.* 2015b.

En las Tablas 7 y 8 se muestran los valores de *FC* y *RC* de las proteínas que mostraron diferencias estadísticamente significativas de abundancia y en el *PR*, en respuesta al PSS.

Tabla 7. *Fold change* (FC) y *relative change* (RC) de los *spots* de proteína con diferencias de volumen entre la carne control y DFD. Fuente: Franco *et al.* 2015a.

Spot code	Protein name	Fold change (FC)	Relative change (RC)
C5	Myosin light chain 3 (MYL3)	- ∞	-0.057
C6	Myosin light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle (MYL6B)	-5.68	-0.294

Tabla 7. Cont.

Spot code	Protein name	Fold change (FC)	Relative change (RC)
C9	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform (MYL2)	-2.40	-0.286
C11	Troponin C type 2, fast (TNNC2)	- ∞	-0.060
D1	Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6GAL1)	+20.00	+0.140
D2	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B)	+3.79	+0.045
D3	Triosephosphate isomerase (TPI1)	+2.25	+0.100
D5	Cofilin-2 (CFL2)	+ ∞	+0.124
D6	Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform (MYLPF)	+ ∞	+0.475
D7	Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform (MYLPF-1)	+ ∞	+1.000

En la Tabla 7 y representado gráficamente en la Fig. 10, el estadístico *RC* nos indica que las proteínas MYL6B, MYL2, TNNC2 y MYL3 están sobrerrepresentadas en las muestras control, ya que sus valores de *RC* son menores que cero. Sin embargo, las proteínas ATP5B, TPI1, CFL2, STGAL1 y MYLPF se encuentran sobrerrepresentadas en las muestras DFD (*RC* > 0). La proteína MYL6B resultó ser la más sobrerrepresentada en la carne control. Por otro lado, dos isoformas de MYLPF fueron las que presentaron una mayor intensidad de *spot* en carne DFD en comparación con la carne control. De estas, el *spot* D7 fue el que presentó una mayor sobrerrepresentación en carne DFD, con un valor de *RC* = +1,0.

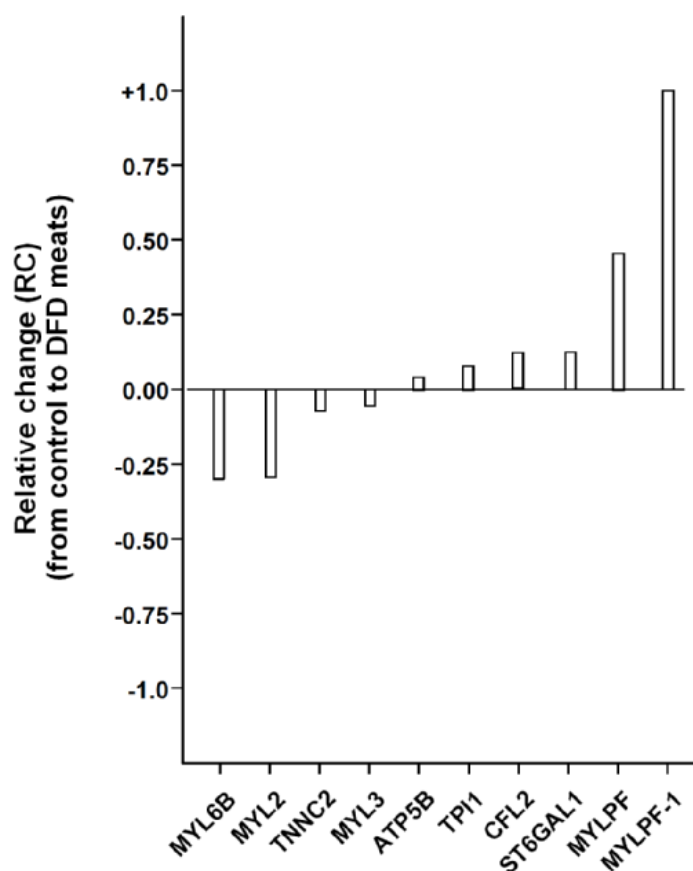


Fig. 10. Valores de *RC* de los *spots* de proteína con diferencias significativas en su abundancia entre las muestras control y DFD del músculo LT de bovino. Fuente: Franco *et al.* 2015a.

Por otro lado, la Tabla 8 y la Fig. 11, muestran que, de acuerdo con los resultados anteriores, las isoformas de MYLPF fueron las que mostraron un mayor aumento en el grado de fosforilación en carne DFD, con respecto a la carne control. En concreto, el *RC* de la isoforma de MYLPF contenida en el *spot* 54 fue de +1,0.

Tabla 8. Cuantificación del cambio en el PR de las proteínas entre carne control y DFD por medio de los coeficientes FC y RC. Fuente: Mato *et al.* 2019

Spot no. ^a	Protein (isospot)	FC	RC	Spot no.	Protein (isospot)	FC	RC
1	PGM1 (1)	+∞	+0.44	27	ACTA1 (7)	-∞	-0.39
5	PGM1 (2)	-4.50	-0.30	30	TNNT1 (1)	-∞	-0.78
6	UQCRC1	-∞	-0.13	30A	TNNT1 (2)	+∞	+0.76
7	ENO3 (1)	+∞	+0.57	33	HSPB1 (1)	-∞	-0.52
8	ENO3 (2)	+∞	+0.51	34	HSPB1 (2)	+∞	+0.73
9	ENO3 (3)	+∞	+0.38	37	HSPB1 (3)	+∞	+0.69
10	ACTA1 (1)	+∞	+0.35	44	MYL6B (1)	-∞	-0.49
11	ACTA1 (2)	+∞	+0.33	46	MYL6B (2)	-∞	-0.14
15	CKM (1)	+∞	+0.37	50	HSPB6	-∞	-0.10
16	CKM (2)	+∞	+0.32	51	MYL2 (1)	-∞	-0.40
18	ACTA1 (3)	-∞	-0.13	52	MYL2 (2)	-∞	-0.39
19	ACTA1 (4)	-∞	-0.16	53	MYLPF (1)	+∞	+0.99
20	ACTA1 (5)	-∞	-0.14	54	MYLPF (2)	+∞	+1.00
21	ACTA1 (6)	-∞	-0.12				
22	TNNT3 (1)	+∞	+0.74				
23	TNNT3 (2)	+∞	+0.73				
24	TNNT3 (3)	+∞	+0.70				
25	TNNT3 (4)	+∞	+0.67				
26	CAPZA2	+∞	+0.77				

^a Numeración de los spots según su posición en el gel asignada en Fig. 8.

Además, TNNT3 (*spots* 22-25), TNNT1 (*spot* 30 A), CAPZA2 (*spot* 26) y HSPB1 (*spot* 34) fueron las otras proteínas que sufrieron un mayor aumento en el estatus de fosforilación en carne DFD. En contraposición, en la Fig. 11 podemos observar que TNNT1 (*spot* 30) fue la proteína con mayor nivel de fosforilación en carne control, con respecto a DFD. En todos los casos, los valores absolutos de *RC* fueron mayores que 0,70.

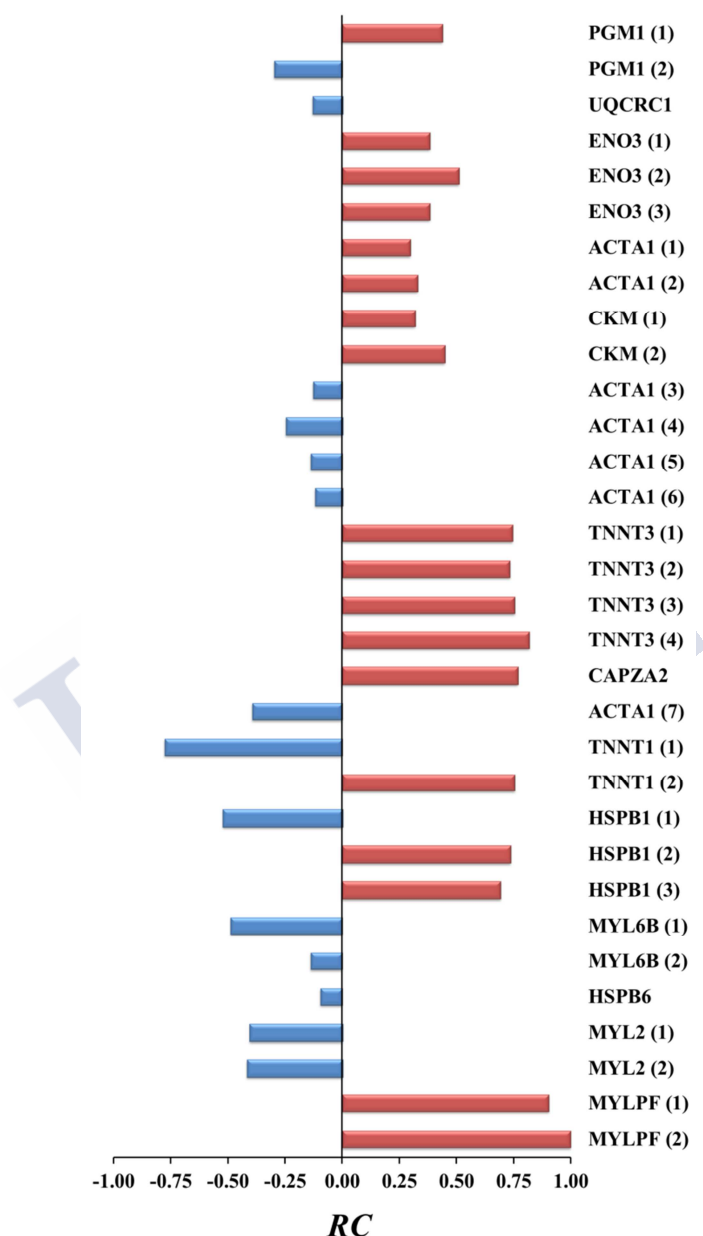


Fig 11. Cuantificación de los cambios en los niveles de fosforilación ($P < 0,05$) de las fosfoproteínas entre las muestras de carne control y DFD del músculo LT de bovino, mediante el coeficiente *RC*. Se muestra el nivel mayor (rojo) o menor (azul) de fosforilación en carne DFD con respecto a la control. Fuente: Mato *et al.* 2019

4.5. CATEGORIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS CON CAMBIOS ASOCIADOS AL PSS

Mediante las herramientas AmiGO Slimmer (http://amigo1.geneontology.org/cgi-bin/amigo/slimmer?session_id=) y QuickGo (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>), se categorizó a las nueve proteínas diferencialmente expresadas entre muestras DFD y control, así como a las 13 proteínas no redundantes que presentaron diferencias en el grado de fosforilación entre muestras control y DFD, dentro de las tres ontologías génicas (función molecular, función biológica y componente celular).

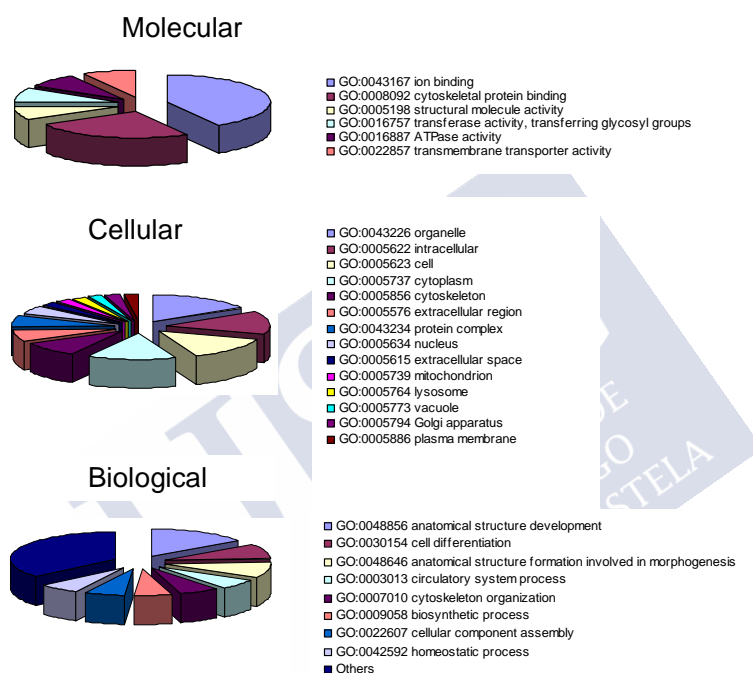


Fig. 12. Distribución de los términos funcionales GO (GO Slim) de las tres ontologías (función molecular, componente celular y función biológica) de las nueve proteínas con diferencias en el volumen entre muestras de carne control y DFD. Los términos GO Slim se obtuvieron a través de la herramienta Slimmer de AmiGO. Fuente: Franco *et al.* 2015a

El conjunto de las nueve proteínas con diferencias en la abundancia entre muestras DFD y control, presentó principalmente funciones moleculares de unión de iones calcio y de unión al citoesqueleto. Además, estas proteínas participan mayoritariamente en procesos biológicos de diferenciación celular y desarrollo de la estructura anatómica. Por último, las proteínas diferencialmente expresadas en respuesta al PSS se encuentran principalmente en el citoplasma, en los orgánulos celulares y formando parte del citoesqueleto, aunque también pueden localizarse en la región extracelular (Fig. 12 y Tabla 9).

Tabla 9. Lista de términos e identificadores GO (proceso biológico, función molecular y componente celular) de las nueve proteínas con diferencias significativas ($P < 0,05$) en el volumen entre muestras de carne control y DFD. Fuente: Franco *et al.* 2015a.

Full protein name	Protein name	UniprotKB accession number	Ensemble gene accession number	GO Identifier and GO term name ^a
Myosin light chain 3	MYL3	P85100	ENSBTAG00000008394	Process: GO:0002026 (regulation of the force of heart contraction), GO:0006942 (regulation of striated muscle contraction), GO:0055010 (ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis), GO:0060048 (cardiac muscle contraction), GO:0003785 (actin monomer binding), GO:0005509 (calcium ion binding), GO:0016459 (myosin complex), GO:0031672 (A band), GO:0031674 (I band) Function: GO:0003785 (actin monomer binding), GO:0005509 (calcium ion binding) Component: GO:0016459 (myosin complex), GO:0031672 (A band), GO:0031674 (I band)
Myosin light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	MYL6B	Q148H2	ENSBTAG000000031217	Function: GO:0005509 (calcium ion binding) Component: GO:0070062 (extracellular vesicular exosome)
Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	MYL2	F1ME15	ENSBTAG000000018369	Process: GO:0003007 (heart morphogenesis), GO:0007507 (heart development), GO:0009791 (post-embryonic development), GO:0030308 (negative regulation of cell growth), GO:0042694 (muscle cell fate specification), GO:0048747 (muscle fiber development), GO:0055003 (cardiac myofibril assembly), GO:0055010 (ventricular cardiac muscle tissue morphogenesis), GO:0060047 (heart contraction), GO:0060048 (cardiac muscle contraction). Function: GO:0003785 (actin monomer binding), GO:0005509 (calcium ion binding). Component: GO:0005856 (cytoskeleton), GO:0015629 (actin cytoskeleton), GO:0030016 (myofibril)
Troponin C type 2, fast	TNNC2	Q148C2	ENSBTAG000000046725	Process: GO:0003009 (skeletal muscle contraction) Function: GO:0003779 (actin binding), GO:0005509 (calcium ion binding) Component: GO:0005861 (troponin complex)

Tabla 9. Cont.

Full protein name	Protein name	UniprotKB accession number	Ensemble gene accession number	GO Identifier and GO term name ^a
Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1	ST6GAL1	Q2KIW7	ENSBTAG00000010357	<p>Process: GO:0006486 (protein glycosylation), GO:0097503 (sialylation)</p> <p>Function: GO:0008373 (sialyltransferase activity), GO:0016740 (transferase activity), GO:0016757 (transferase activity, transferring glycosyl groups)</p> <p>Component: GO:0005794 (Golgi apparatus), GO:0016020 (membrane), GO:0016021 (integral component of membrane)</p>
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	P00829	ENSBTAG00000013315	<p>Process: GO:0001525 (angiogenesis), GO:0001649 (osteoblast differentiation), GO:0006629 (lipid metabolic process), GO:0006754 (ATP biosynthetic process), GO:0006810 (transport), GO:0006811 (ion transport), GO:0006933 (negative regulation of cell adhesion involved in substrate-bound cell migration), GO:0015986 (ATP synthesis coupled proton transport), GO:0015991 (ATP hydrolysis coupled proton transport), GO:0015992 (proton transport), GO:0046034 (ATP metabolic process), GO:0051453 (regulation of intracellular pH) Function: GO:0000166 (nucleotide binding), GO:0005515 (protein binding), GO:0005524 (ATP binding), GO:0016787 (hydrolase activity), GO:0016820 (hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances), GO:0016887 (ATPase activity), GO:0042288 (MHC class I protein binding), GO:0046933 (proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism), GO:0046961 (proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism) Component: GO:0005634 (nucleus), GO:0005739 (mitochondrion), GO:0005743 (mitochondrial inner membrane), GO:0005753 (mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex), GO:0005886 (plasma membrane), GO:0009986 (cell surface), GO:0016020 (membrane), GO:0031966 (mitochondrial membrane), GO:0033178 (proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain), GO:0042645 (mitochondrial nucleoid), GO:0045261 (proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)), GO:0070062 (extracellular vesicular exosome)</p>

Tabla 9. Cont.

Full protein name	Protein name	UniprotKB accession number	Ensemble gene accession number	GO Identifier and GO term name ^a
Cofilin-2	CFL2	Q148F1	ENSBTAG00000015053	Process: GO:0007015 (actin filament organization), GO:0030042 (actin filament depolymerisation), GO:0030836 (positive regulation of actin filament depolymerisation), GO:0045214 (sarcomere organization), GO:0046716 (muscle cell cellular homeostasis), GO:0061001 (regulation of dendritic spine morphogenesis) Function: GO:0003779 (actin binding) Component: GO:0005615 (extracellular space), GO:0005622 (intracellular), GO:0005634 (nucleus), GO:0005737 (cytoplasm), GO:0005856 (cytoskeleton), GO:0015629 (actin cytoskeleton), GO:0016363 (nuclear matrix), GO:0031674 (I band), GO:0070062 (extracellular vesicular exosome)
Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform	MYLPF	Q0P571	ENSBTAG00000021218	Process: GO:0007519 (skeletal muscle tissue development) Function: GO:0005509 (calcium ion binding), GO:0008307 (structural constituent of muscle), GO:0046872 (metal ion binding) Component: GO:0005765 (lysosomal membrane), GO:0016459 (myosin complex)
^a Obtenido de http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/ para <i>B. taurus</i>				

En cuanto a las 13 proteínas con diferencias en el estatus de fosforilación entre carne DFD y control, participan principalmente en procesos biológicos como la síntesis de glucógeno o la contracción muscular.

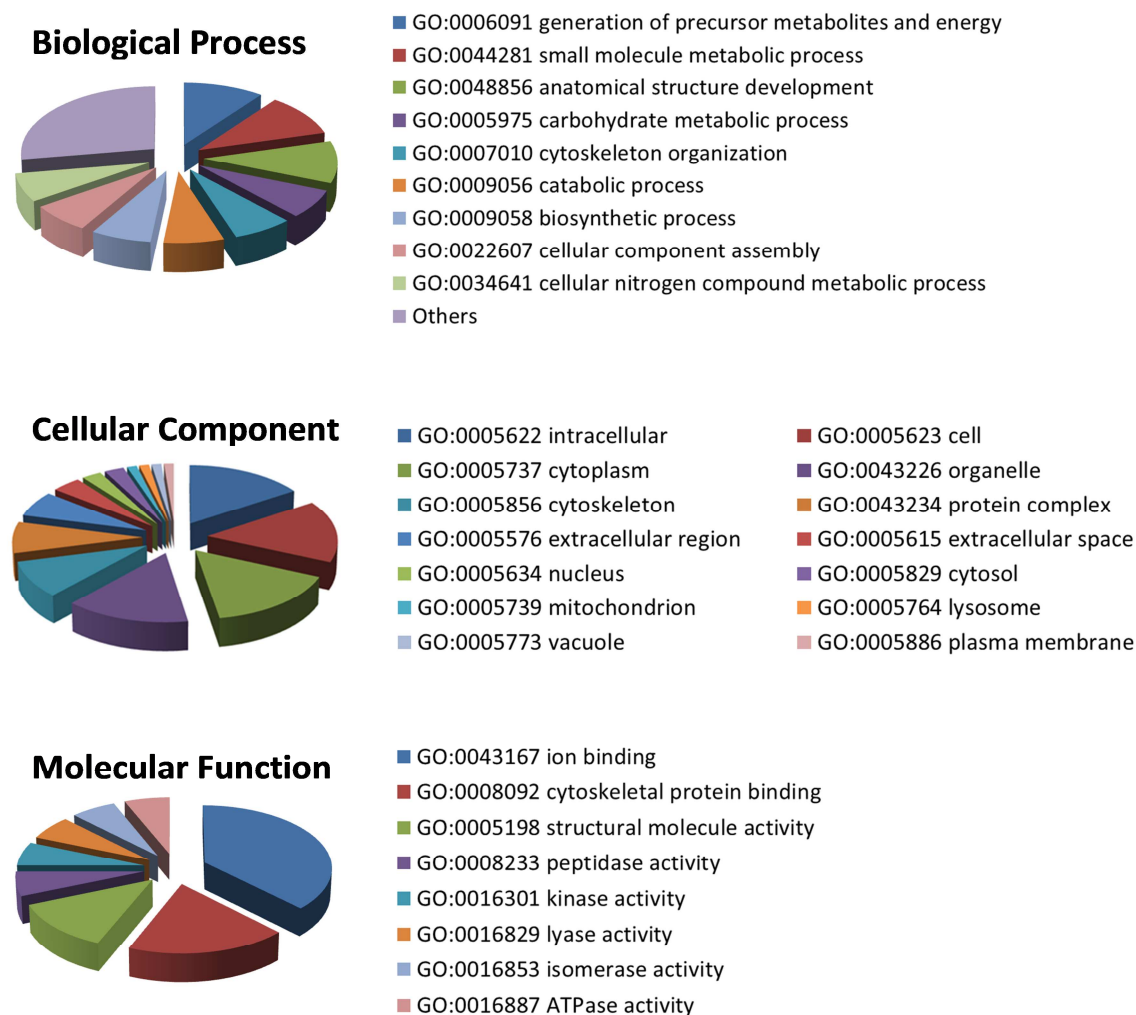


Fig.13. Distribución de los términos funcionales GO (GO Slim) de las tres ontologías (función molecular, componente celular y función biológica) para las trece proteínas con diferencias ($P < 0,05$) en el nivel de fosforilación entre muestras de carne control y DFD. Los términos GO Slim se obtuvieron a través de la herramienta Slimmer de AmiGO. Fuente: Mato *et al.* 2019

Al igual que las proteínas diferencialmente expresadas en respuesta al PSS, estas 13 proteínas presentan principalmente funciones moleculares de unión de iones calcio y de unión al citoesqueleto. Por último, se encuentran tanto en el espacio extracelular y en la membrana celular, como dentro de la célula, formando parte de los complejos de miosina o de troponina (Fig. 13 y Tabla 10).

Tabla 10. Lista de identificadores y términos (proceso biológico, función molecular y componente celular) de las trece proteínas con diferencias en el estatus de fosforilación entre las muestras de carne control y DFD. Fuente: Mato *et al.* 2019

Protein name	Abrev.	UniprotKB accession number	Ensemble gene accession number	GO Identifier and GO term name
Phosphoglucomutase-1	PGM1	Q08DP0	ENSBTAG00000019011	Process: GO:0005975 (carbohydrate metabolic process) GO:0005978 (glycogen biosynthetic process) GO:0006006 (glucose metabolic process) GO:0019388 (galactose catabolic process) GO:0071704 (organic substance metabolic process) Function: GO:0000287 (magnesium ion binding) GO:0004614 (phosphoglucomutase activity) GO:0004614 (phosphoglucomutase activity) GO:0016868 (intramolecular transferase activity, phosphotransferases) GO:0046872 (metal ion binding) Component: GO:0005737 (cytoplasm) GO:0005829 (cytosol)
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	UQCRC1	P31800	ENSBTAG00000019096	Process: GO:0006122 (mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c) GO:0009060 (aerobic respiration) GO:0016485 (protein processing) GO:0055114 (oxidation-reduction process) Function: GO:0003824 (catalytic activity) GO:0004222 (metalloendopeptidase activity) GO:0008270 (zinc ion binding) GO:0046872 (metal ion binding) Component: GO:0005739 (mitochondrion) GO:0005743 (mitochondrial inner membrane) GO:0005750 (mitochondrial respiratory chain complex III) GO:0016020 (membrane) GO:0070469 (respiratory chain)
Beta-enolase	ENO3	Q3ZC09	ENSBTAG00000005534	Process: GO:0006096 (glycolytic process) Function: GO:0000287 (magnesium ion binding) GO:0004634 (phosphopyruvate hydratase activity) GO:0016829 (lyase activity) GO:0046872 (metal ion binding) Component: GO:0000015 (phosphopyruvate hydratase complex) GO:0005615 (extracellular space) GO:0005737 (cytoplasm) GO:0005886 (plasma membrane) GO:0070062 (extracellular exosome)

Tabla 10. Cont.

Protein name	Abrev.	UniprotKB accession number	Ensemble gene accession number	GO Identifier and GO term name
Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	P68138	ENSBTAG00000046332	<p>Process: GO:0010628 (positive regulation of gene expression) GO:0030240 (skeletal muscle thin filament assembly) GO:0048741 (skeletal muscle fiber development) GO:0090131 (mesenchyme migration) Function: GO:0000166 (nucleotide binding) GO:0005524 (ATP binding) Component: O:0001725stress fiber GO:0005615 (extracellular space) GO:0005737 (cytoplasm) GO:0005856 (cytoskeleton) GO:0005865 (striated muscle thin filament) GO:0005884 (actin filament) GO:0015629 (actin cytoskeleton) GO:0030017 (sarcomere) GO:0030027 (lamellipodium) GO:0030175 (filopodium) GO:0044297 (cell body) GO:0070062 (extracellular exosome) GO:0072562 (blood microparticle)</p> <p>Process: GO:0009408 (response to heat) GO:0016310 (phosphorylation) GO:0046314 (phosphocreatine biosynthetic process) Function: GO:0000166 (nucleotide binding) GO:0003824 (catalytic activity) GO:0004111 (creatine kinase activity) GO:0004111 (creatine kinase activity) GO:0016301 (kinase activity) GO:0016740 (transferase activity) GO:0016772 (transferase activity, transferring phosphorus-containing groups) Component: GO:0005615 (extracellular space) GO:0005737 (cytoplasm)</p>
Creatin kinase M-type	CKM	Q9XSC6	ENSBTAG00000013921	

Tabla 10. Cont.

Protein name	Abrev.	UniprotKB accession number	Ensemble gene accession number	GO Identifier and GO term name
Troponin T, fast skeletal muscle	TNNT3	Q8MKI3	ENSBTAG00000022158	Process: GO:0003009 (skeletal muscle contraction) GO:0006937 (regulation of muscle contraction) GO:0006942 (regulation of striated muscle contraction) GO:0043462 (regulation of ATPase activity) Function: GO:0003779 (actin binding) GO:0005523 (tropomyosin binding) GO:0030172(troponin C binding) GO:0030899 (calcium-dependent ATPase activity) GO:0031013 (troponin I binding) GO:0048306 (calcium-dependent protein binding) Component: GO:0005861 (troponin complex)
F-actin-capping protein subunit alpha-2	CAPZA2	Q5E997	ENSBTAG00000004072	Process: GO:0051016 (barbed-end actin filament capping) GO:0051693 (actin filament capping) Function: GO:0003779 (actin binding) Component: GO:0005903 (brush border) GO:0008290 (F-actin capping protein complex) GO:0016020 (membrane) GO:0030863 (cortical cytoskeleton) GO:0070062 (extracellular exosome)
Troponin T, slow skeletal muscle	TNNT1	Q8MKH6	ENSBTAG00000006419	Process: GO:0003009 (skeletal muscle contraction) GO:0006937 (regulation of muscle contraction) GO:0014883 (transition between fast and slow fiber) GO:0045932 (negative regulation of muscle contraction) Function: GO:0005523 (tropomyosin binding) Component: GO:0005861 (troponin complex)
Heat shock protein beta-1	HSPB1	Q3T149	ENSBTAG00000011969	Component: GO:0005634 (nucleus) GO:0005737 (cytoplasm) GO:0005819 (spindle) GO:0005856 (cytoskeleton)

Tabla 10. Cont.

Protein name	Abrev.	UniprotKB accession number	Ensemble gene accession number	GO Identifier and GO term name
Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle	MYL6B	Q148H2	ENSBTAG00000031217	Function: GO:0005509 (calcium ion binding) Component: GO:0070062 (extracellular exosome)
Heat shock protein beta- 6	HSPB6	Q148F8	ENSBTAG00000018598	Function: GO:0005212 (structural constituent of eye lens) GO:0042803 (protein homodimerization activity) Component: GO:0005634 (nucleus) GO:0005737 (cytoplasm)
Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	MYL2	Q3SZE5	ENSBTAG00000018369	Process: GO:0002026 (regulation of the force of heart contraction) GO:0007507 (heart development) GO:0060047 (heart contraction) GO:0098735 (positive regulation of the force of heart contraction) Function: GO:0005509 (calcium ion binding) GO:0046872 (metal ion binding) Component: GO:0005737 (cytoplasm) GO:0016459 (myosin complex) GO:0031672 (A band)
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	MYLPF	Q0P571	ENSBTAG00000021218	Process: GO:0007519 (skeletal muscle tissue development) Function: GO:0005509 (calcium ion binding) GO:0008307 (structural constituent of muscle) GO:0046872 (metal ion binding) Component: GO:0005765 (lysosomal membrane) GO:0016459 (myosin complex)

Se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de las proteínas que presentaron cambios en el volumen, así como cambios en el nivel de fosforilación, en respuesta al PSS, mediante FatiGO/Babelomics (Al-Shahrour *et al.* 2004) en cada base de datos, GO, InterPro y KEGG. En cuanto a las proteínas que presentaron cambios significativos en el volumen entre carne control y DFD, la Tabla 11 muestra que un total de 4 términos GO, correspondientes a la función molecular, presentaron una sobrerrepresentación significativa ($P < 0,05$), revelando funciones de unión al calcio (GO:0005509), al citoesqueleto (GO:0003779) y de unión de los monómeros de actina (GO:0003785). Solo un término de la base de datos InterPro mostró un enriquecimiento significativo ($P < 0,05$), el cual también indicó funciones de unión al calcio (IPR002048). Por último, se obtuvieron un total de 4 términos con una sobrerrepresentación significativa ($P < 0,05$) correspondientes a rutas de la base de datos KEGG que intervienen en uniones estrechas (bta04530), regulación del citoesqueleto de actina (bta04810), adhesiones focales (bta04510) y la migración transendotelial de leucocitos (bta04670).

En lo referente a las proteínas con cambios significativos en el grado de fosforilación entre carne control y DFD, la Tabla 12 muestra que 3 términos GO, pertenecientes al componente celular, mostraron un enriquecimiento significativo ($P < 0,05$): citoesqueleto de actina (GO:0015629), miofibrillas (GO:0030016) y fibras contráctiles (GO:0043292). Sólo 3 términos de la base de datos InterPro, correspondientes a Troponina (IPR001978), alfa-cristalina/Hsp (IPR001436) y Hsp20 (IPR002068), revelaron una sobrerrepresentación significativa ($P < 0,05$). Finalmente, numerosas rutas KEGG manifestaron un enriquecimiento significativo ($P < 0,05$), que intervienen en rutas metabólicas (bta01100), glucólisis/gluconeogénesis (bta00010), contracción del músculo cardíaco (bta04260), uniones estrechas (bta04530), regulación del citoesqueleto de actina (bta04810), adhesiones focales (bta04510) y migración transendotelial de leucocitos (bta04670).

Tabla 11. Análisis de enriquecimiento con el software FatiGO que muestra las ontologías significativamente sobrerrepresentadas en carne normal y DFD, al hacer una comparación entre este estudio y el resto del genoma bovino ($P < 0.05$). Fuente: Franco *et al.* 2015a.

GO term	Term size	Term annotation % (study vs genome)	Protein ID	Odds ratio (log _e)	p-value ^b	Adjusted p-value ^c
GO molecular function ^a						
calcium ion binding (GO:0005509)	693	44.44% vs 3.27%	MYL2, MYL3, MYL6B, MYLPF	3.1625	0.0001286	0.03086
cytoskeletal protein binding (GO:0008092)	313	33.33% vs 1.47%	MYL2, MYL3, CFL2	3.5096	0.000256	0.04608
actin binding (GO:0003779)	187	33.33% vs 0.87%	MYL2, MYL3, CFL2	4.0373	0.00005572	0.02006
actin monomer binding (GO:0003785)	5	22.22% vs 0.01%	MYL2, MYL3	7.6027	0.000001624	0.001169**
Calcium-binding EF-hand (IPR002048)	257	44.44% vs 1.2%	MYL2, MYL3, MYL6B, MYLPF	4.1856	0.000002607	0.00506**
bta04530	75	22.22% vs 0.35%	MYL2, MYLPF	4.4075	0.0004437	0.02984
bta04810	97	33.33% vs 0.45%	MYL2, MYLPF, CFL2	4.7133	0.00000781	0.001461**
bta04510	90	22.22% vs 0.42%	MYL2, MYLPF	4.2199	0.0006383	0.02984
bta04670	79	22.22% vs 0.37%	MYL2, MYLPF	4.3539	0.0004922	0.02984

^a No se detectaron términos significativos ($P \leq 0,05$) para las categorías GO correspondientes al componente celular y proceso biológico. ^b Probabilidad mediante el test exacto de Fisher. (dos colas). ^c P-valores ajustados por comparaciones múltiples mediante el método *false discovery rate* (FDR). ** Términos significativos para un P-valor de 0,01.

Tabla 12. Ontologías significativamente sobrerrepresentadas ($P < 0,05$, estudio vs. resto del genoma bovino) en carne DFD y normal después del análisis de enriquecimiento por medio del software FatiGo. Fuente: Mato *et al.* 2019

Database/GO term	Term size	Term annotation (%)/ study vs genome	Protein (abbrev.)	Odds ratio (log _e)	<i>P</i> -value ^a	Adjusted <i>P</i> -value ^b
KEGG/						
bta01100	732	30.8 vs 3.4	PGM1, UQCRC1, ENO3, CKM	2.52	0.001	0.040
bta00010	42	15.4 vs 0.3	PGM1, ENO3	4.56	0.0003	0.037
bta04260	48	15.4 vs 0.2	UQCRC1, MYL2	4.42	0.0004	0.037
bta04530	75	15.4 vs 0.4	MYL2, MYLPF	3.96	0.001	0.040
bta04810	97	15.4 vs 0.5	MYL2, MYLPF	3.69	0.002	0.042
bta04510	90	15.4 vs 0.4	MYL2, MYLPF	3.77	0.001	0.042
bta04670	79	15.4 vs 0.4	MYL2, MYLPF	3.90	0.001	0.040
InterPro/						
Troponin (IPR001978)	5	15.4 vs 0.01	TNNT3, TNNT1	7.15	0.000004	0.007
Alpha crystallin/Heat shock protein (IPR001436)	9	15.4 vs 0.03	HSPB1, HSPB6	6.30	0.00001	0.012
Heat shock protein Hsp20 (IPR002068)	11	15.4 vs 0.04	HSPB1, HSPB6	6.05	0.00002	0.012

Table 12. Cont.

Database/GO term	Term size	Term annotation (%)/ study vs genome	Protein (abbrev.)	Odds ratio (log _e)	P-value ^a	Adjusted P-value ^b
GO cellular component/						
actin cytoskeleton (GO:0015629)	236	23.1 vs 1.1	CAPZA2, TNNT1, MYL2	3.29	0.0004	0.042
myofibril (GO:0030016)	59	15.4 vs 0.3	TNNT1, HSPB1	4.20	0.0006	0.042
contractile fiber (GO:0043292)	64	15.4 vs 0.3	TNNT1, HSPB1	4.12	0.0007	0.042

^a Probabilidad mediante el test exacto de Fisher (dos colas). ^b P-valores ajustados por comparaciones múltiples mediante el método *false discovery rate* (FDR). No se han detectado términos significativos ($P \leq 0,05$) para las categorías GO correspondientes al proceso biológico y función molecular.

4.6. REDES DE INTERACCIÓN PROTEICA

Con el objetivo conocer las interacciones funcionales entre las proteínas identificadas diferencialmente expresadas en carne control y DFD, así como entre éstas y otras proteínas de *B. taurus*, se utilizó la base de datos STRING v9.1 (Franceschini *et al.* 2013). Al establecer los siguientes parámetros: “*additional (white) nodes*” e “*interaction shown*” fijados en 1 y un intervalo de confianza medio (*threshold*: 0.4), 5 proteínas con diferencias en volumen en respuesta al PSS formaron una red principal de interacciones directas (MYL3, MYL6B, MYL2, MYLPF y TNNT1), todas ellas con funciones musculares, estructurales y contráctiles. La TNNC2 fue remplazada por TNNT1, ya que la base de datos STRING v9.1 no halló ninguna proteína con el nombre TNNC2 en *B. taurus*. Además, se observó otro grupo menor, formado únicamente por dos de las proteínas con diferencias en la abundancia en respuesta al PSS: CFL2, con función estructural y contráctil y TPI1, que interviene en el metabolismo (Fig. 14). Finalmente, las proteínas ST6GAL y ATP5B no presentaron ninguna unión a estas dos redes de proteína. Sin embargo, ATP5B formó parte de una tercera red de interacción cuando los parámetros “*additional (white) nodes*” e “*interaction shown*” se fijaron en 1.

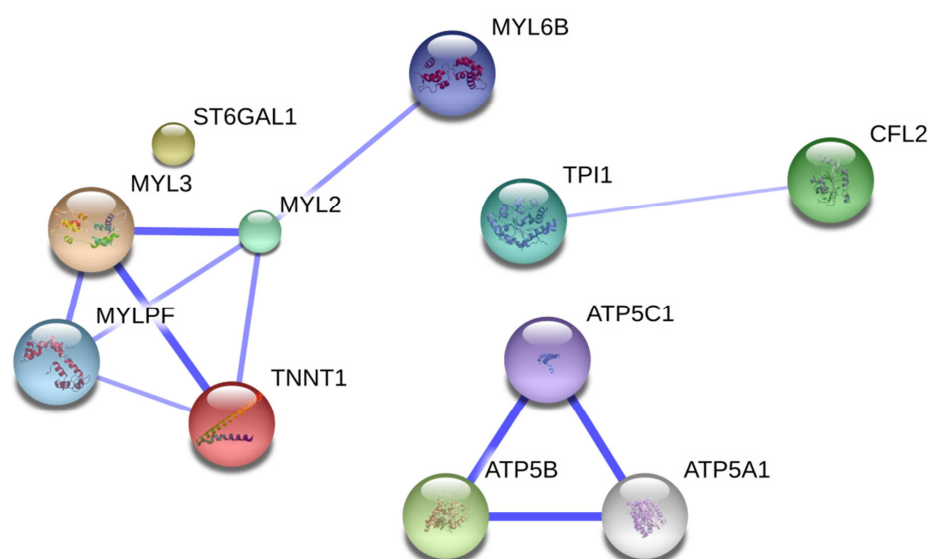


Fig. 14. Redes de interacción proteína-proteína para las proteínas con diferencias en volumen entre las muestras de carne control y DFD en respuesta al PSS, de acuerdo con la base de datos STRING v9.1. Los círculos representan las proteínas, mientras que las líneas representan las interacciones funcionales conocidas o predichas. El grosor de la línea indica la fuerza de la asociación (intervalo de confianza intermedio, *threshold*: 0.4). Fuente: Franco *et al.* 2015a

Teniendo en cuenta exclusivamente la co-expresión de las proteínas identificadas y con un intervalo de confianza alto (*threshold*: 0.7), se observó que MYL3 mostró una interacción más fuerte con MYL2 y MYL1 con TNNT1 y, además, éstas eran las únicas redes de interacción entre las proteínas con diferencias en el volumen en respuesta al PSS, todas ellas con funciones musculares y estructurales-contráctiles (Fig. 15).

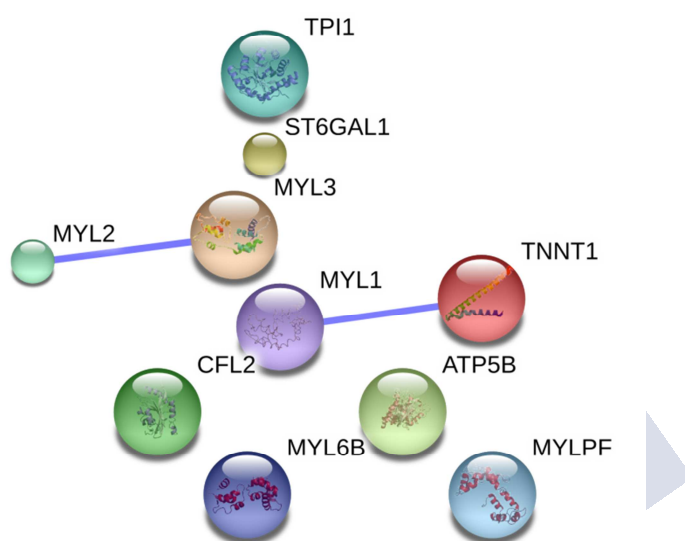


Fig. 15. Redes de interacción proteína-proteína para las proteínas con diferencias en volumen entre la carne control y DFD en respuesta al PSS, de acuerdo con la base de datos STRING v9.1 y con un intervalo de confianza elevado (*threshold*: 0.7). Los círculos representan las proteínas, mientras que las líneas representan las interacciones funcionales conocidas o predichas. El grosor de la línea indica la fuerza de la asociación. Fuente: Franco *et al.* 2015a

A la hora de estudiar las interacciones funcionales entre las 13 proteínas no redundantes con diferencias en el estatus de fosforilación entre carne control y DFD, se utilizó la versión de la base de datos STRING v10.5. Fijando los parámetros en intervalo de confianza medio (*threshold*: 0.4) y ninguna interacción mostrada en el primer y segundo nivel (“*none interactions shown, 1st and 2nd shell*”), se obtuvo una red de interacción principal en la que se incluyen todas las proteínas con diferencias en el nivel de fosforilación en respuesta al PSS (MYL2, MYLPF, TNNT1, TNNT3, ACTA1, HSPB1, PGM1, ENO3, UQCRC1 y CAPZA2), a excepción de HSPB6 y CKM (Fig. 16a).

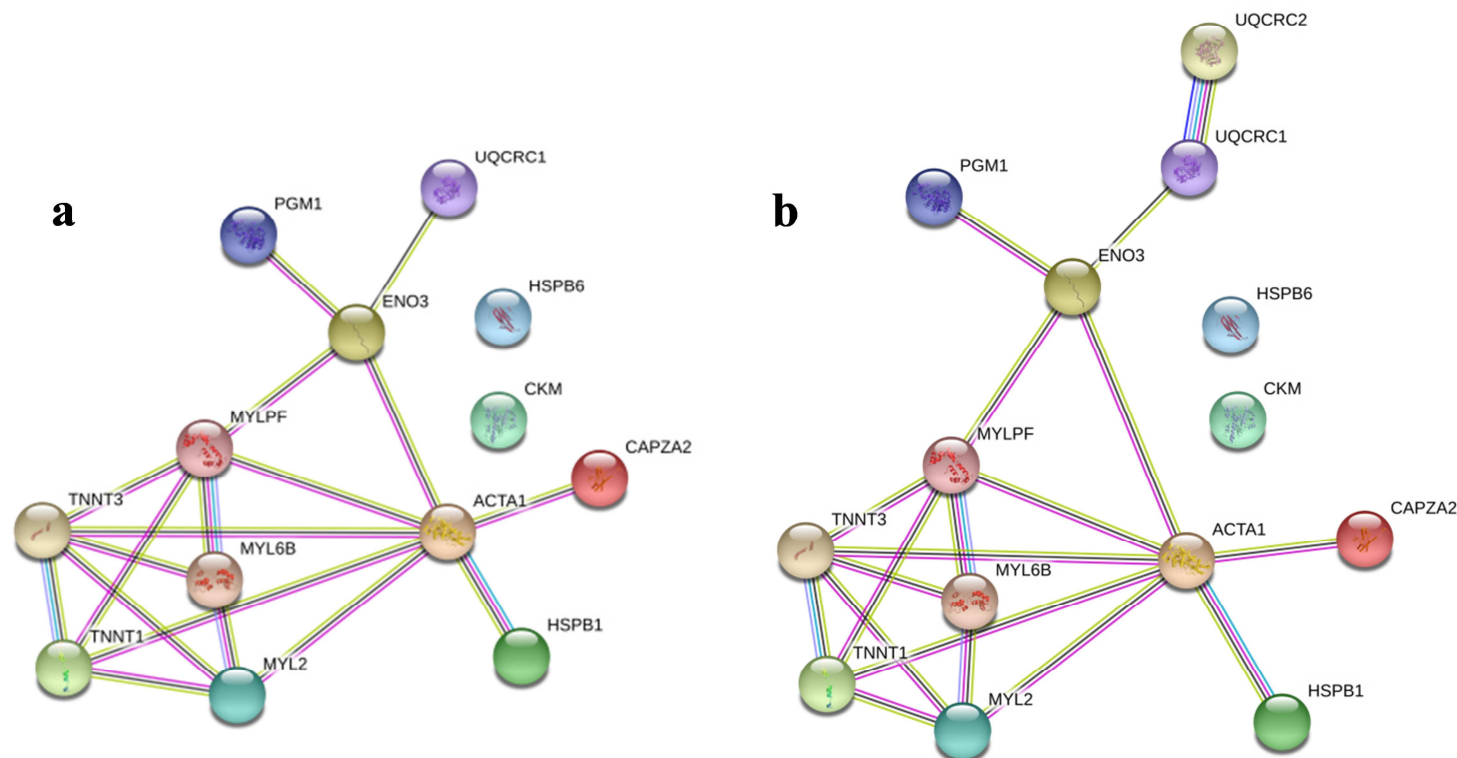


Fig. 16. Redes de interacción proteína-proteína para las proteínas con diferencias en el nivel de fosforilación entre la carne control y DFD en respuesta al PSS, obtenidas mediante la base de datos STRING v10.5. Los círculos representan las proteínas. Las líneas coloreadas indican los diferentes tipos de interacción (azul: co-ocurrencia; azul claro: bases de datos; negro: coexpresión; verde: genes vecinos; violeta: evidencias experimentales; rojo: *text mining*). **a** Red de interacción STRING de las proteínas con diferencias en el nivel de fosforilación identificadas en este estudio y parámetros fijados: intervalo de confianza medio (*threshold*: 0.4) y ninguna interacción mostrada en el primer y segundo nivel ("none interactions shown, 1st and 2nd shell"). **b** Red de interacción STRING de las proteínas con diferencias en el nivel de fosforilación identificadas en este estudio y parámetros fijados: intervalo de confianza medio (*threshold*: 0.4) y una interacción mostrada en el primer nivel y ninguna en el segundo nivel ("one interaction shown, 1st shell and none interactions shown, 2nd shell"). Fuente: Mato et al. 2019

Diagram illustrating a network of protein interactions. The proteins shown are MYL2, TNNT1, UQCRC1, HSPB6, HSPB1, CAPZA2, ACTA1, ENO3, PGM1, TNNT3, MYLPF, CKM, and MYL6B. The interactions are represented by lines connecting the protein nodes.

90

Al considerar únicamente la co-expresión (“*none interactions shown, 1st and 2nd shell*”) en la base de datos STRING, se obtuvieron dos pequeñas redes de interacción entre fosfoproteínas: una formada por dos proteínas estructurales-contráctiles (MYLPF y TNNT3) y otra constituida por proteínas metabólicas (PGM1, ENO3 y UQCRC1) (Fig. 17).

4.7. ANÁLISIS DE CLÚSTER UPGMA

Con el fin de obtener más información acerca de la co-expresión de las proteínas que presentaron diferencias significativas en el volumen y en el estatus de fosforilación en respuesta al PSS, se llevaron a cabo dos análisis de clúster UPGMA, por medio de las diferencias en el RC (en valor absoluto) entre pares de proteínas.

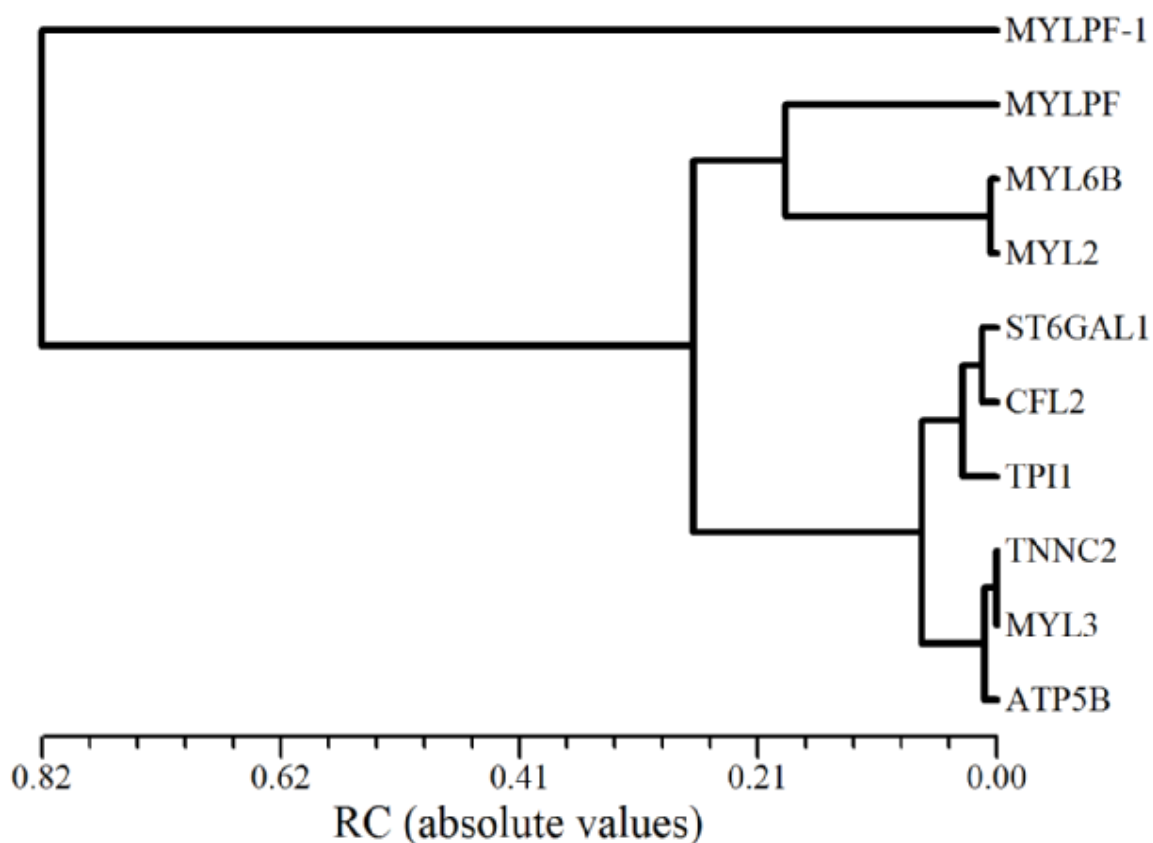
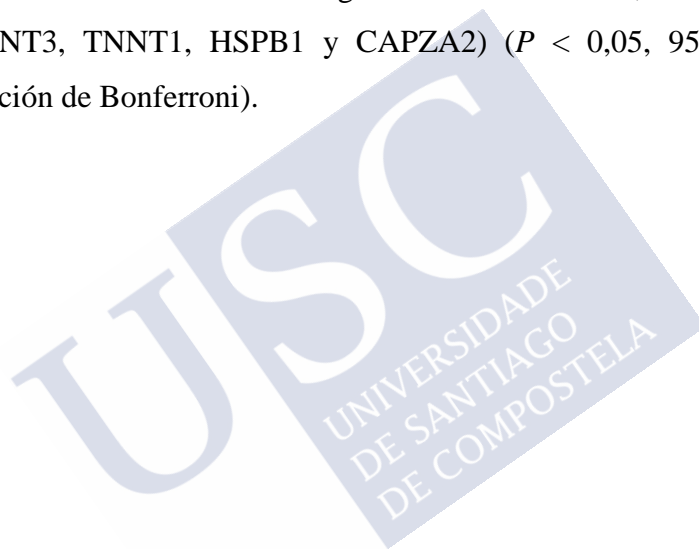


Fig. 18. Dendrograma obtenido a partir de un análisis de clúster *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages (UPGMA)* basado en los valores de RC (en valor absoluto) para los spots de proteína con diferencias significativas ($P < 0,05$) en volumen entre las muestras de carne control y DFD. Fuente: Franco *et al.* 2015a

El dendrograma UPGMA basado en el *RC* de los *spots* de proteína con diferencias en el volumen en respuesta al PSS (Fig. 18), muestra dos grupos diferenciados de proteínas relacionadas, y una proteína aislada del resto: MYLPF. Además, el dendrograma indica que las proteínas con mayor diferencia en el volumen entre muestras control y DFD fueron la proteína aislada MYLPF (*spot* D7) y el grupo formado por las proteínas MYLPF, MYL6B y MYL2.

El dendrograma UPGMA obtenido a partir de los *RC* de los *spot* de proteína con diferencias en el nivel de fosforilación en respuesta al PSS, muestra dos clústeres bien diferenciados de proteínas (Fig. 19). El clúster 2 está formado por las proteínas que presentaron una variación más marcada en el grado de fosforilación, entre carne DFD y control (MYLPF, TNNT3, TNNT1, HSPB1 y CAPZA2) ($P < 0,05$, 95% IC *bootstrap* ajustados con la corrección de Bonferroni).



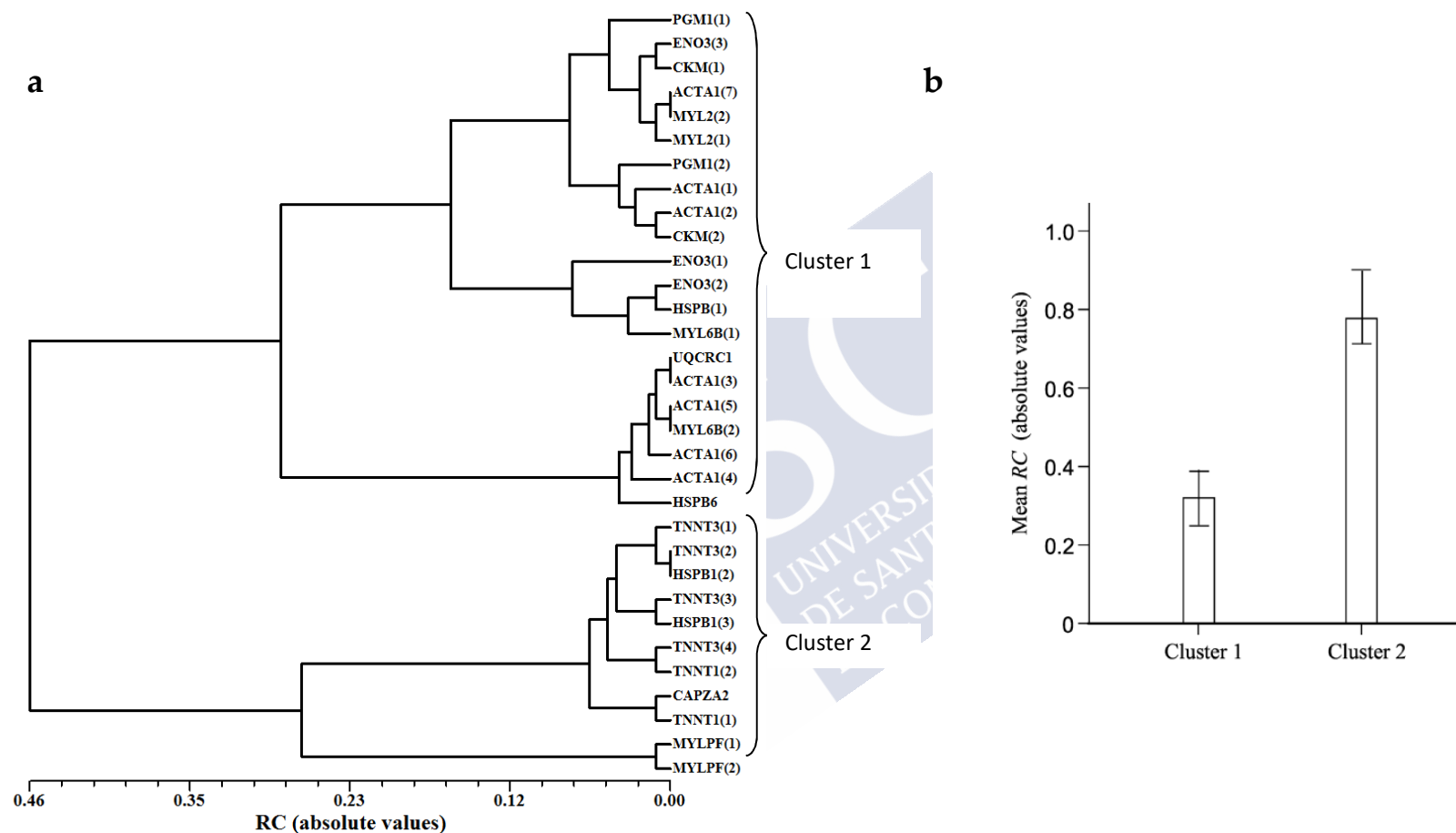


Fig. 19. Análisis de clúster basado en los valores *RC* de las proteínas con diferencias significativas ($P < 0,05$) en el grado de fosforilación, entre carne DFD y control. **a** Dendograma UPGMA construido a partir de una matriz de diferencias en los valores medios de *RC* (en valor absoluto) entre pares de fosfoproteína, mediante el software NTSYS. Los dos grandes clústeres resultantes se han denominado clúster 1 y clúster 2. **b** Valores medios de *RC* (en valor absoluto) de los clústeres de proteínas 1 y 2, junto con sus CIs bootstrap del 99%. Fuente: Mato *et al.* 2019





DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

La proteómica se ha empleado comúnmente a la hora de tratar de desvelar los cambios en la estructura y abundancia de las proteínas, así como los diversos procesos bioquímicos que subyacen a la conversión del músculo en carne (Bendixen 2005; Hollung *et al.* 2007; D'Alessandro & Zolla 2012c; Paredi *et al.* 2012). Sin embargo, previos a la publicación de los resultados del presente estudio, pocos trabajos habían empleado técnicas proteómicas para determinar los cambios que el estrés pre-sacrificio (PSS) produce sobre el proteoma del músculo y sus efectos en la transformación del músculo en carne de baja calidad (Zanetti *et al.* 2013). Así, para nuestro conocimiento, no existen estudios previos a la publicación de los resultados de este trabajo, en esta dirección, en ganado bovino. Por tanto, en el presente estudio se pone de manifiesto, por primera vez, la existencia de cambios en el mapa proteómico del músculo *longissimus thoracis* (LT) de bovino, en respuesta al PSS, a 24 h *post mortem*. La liofilización de las muestras de carne, la purificación de las proteínas y la combinación de técnicas proteómicas como la electroforesis bidimensional (2-DE) y diferentes técnicas de espectrometría de masas (LC-MS/MS y MALDI TOF/TOF MS) ha permitido la identificación de las proteínas que presentaron diferencias estadísticamente significativas en el volumen (cambios cualitativos y cuantitativos), entre muestras de carne DFD y control (no-DFD), del músculo LT de la raza Rubia Gallega. Además, el uso de la tinción específica para fosfoproteínas Pro-Q DPS, acoplado a la 2-DE y la espectrometría de masas (MALDI TOF Y MALDI TOF/TOF), ha demostrado que el mecanismo de fosforilación reversible de las proteínas juega un papel clave en la conversión del músculo LT bovino en carne DFD. Por consiguiente, este estudio es, también, la primera evidencia de la existencia de cambios en el fosfoproteoma del músculo LT bovino, en respuesta al PSS.

5.1. CAMBIOS EN EL MAPA PROTEÓMICO DEL MÚSCULO LT BOVINO EN RESPUESTA PSS

Las proteínas que presentaron diferencias estadísticamente significativas, tanto cuantitativas como cualitativas, en el volumen, en respuesta al PSS, identificadas en este estudio, pertenecían a dos categorías funcionales. La primera de las categorías corresponde a proteínas con funciones estructurales-contráctiles: isoformas de la cadena ligera de la miosina (MYL3, MYL6B), isoformas de la cadena ligera reguladora de la miosina (MYL2, MYLPF), troponina C (TNNC2) y cofilina-2 (CFL2). La siguiente categoría funcional comprende

proteínas implicadas en el metabolismo: triosafosfato isomerasa 1 (TPI1), ATP sintetasa subunidad beta (ATP5B) y beta-galactosidasa alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1).

La terneza es uno de los parámetros de calidad más valorados en la carne (Maltin *et al.* 2003; Paredi *et al.* 2012). El proceso de enternecimiento de la carne tiene lugar durante el período *post mortem*, y se ve afectado por diversos factores como el pH, la temperatura, el contenido en colágeno, el grado de contracción lateral y longitudinal del sarcómero y la proteólisis (Koohmarie 1996; Maltin *et al.* 2003; Pearce *et al.* 2011). A 24 h *post mortem*, los niveles de ATP en el músculo descienden, mientras que se produce un incremento de los niveles de Ca^{2+} , estableciéndose, así, la fase de *rigor mortis*. El acortamiento del sarcómero característico del *rigor mortis*, produce un incremento en la dureza de la carne (Koohmarie 1996; Maltin *et al.* 2003). Sin embargo, está documentado que el PSS genera un consumo significativo de glucógeno *ante mortem*, reduciendo significativamente las reservas del mismo *post mortem*. Esto da lugar a carne con un pH más elevado (Ferguson & Warner 2008; Bourguet *et al.* 2010). El pH más básico contribuye a mantener las fuerzas de repulsión electrostática entre las proteínas miofibrilares, disminuyendo la contracción lateral del sarcómero (Pearce *et al.* 2011). En este estudio, los test de textura mostraron que la carne DFD, procedente de animales afectados por el PSS, era significativamente más tierna a 24 h *post mortem*, que la carne control (no-DFD), en concordancia con trabajos previos (Gregory & Grandin 1998; Silva *et al.* 1999; Jeleníková *et al.* 2008). Silva *et al.* (1999) detectaron que la terneza incrementaba de forma lineal con el pH_u . Ellos proponen que esta relación es debida a que la actividad proteolítica responsable de la degradación de las miofibrillas se produce de forma más lenta en carne con pH_u normal o intermedio, en comparación con la carne con pH_u alto. En otros estudios se ha establecido una relación curvilínea entre la terneza y el pH_u , de modo que la carne más tierna es aquella con pH_u menor que 5,8 o mayor que 6,3, ya que estos valores de pH favorecerían la acción de las proteasas ácidas o neutras respectivamente (Jeleníková *et al.* 2008). Junto con esto, diversos trabajos han demostrado la implicación de las proteínas estructurales específicas del sarcómero como, por ejemplo, las cadenas ligeras de las miosina, la actina o la troponina T; enzimas metabólicas como la fosfoglucomutasa 1, la triosafosfato isomerasa o la enolasa; proteínas de respuesta al estrés, como son las proteínas de choque térmico (HSPs); así como los sistemas de enzimas proteolíticas, en el proceso de enternecimiento la carne (Laville *et al.* 2009; Zapata *et al.* 2009; Guillermin *et al.* 2011; Anderson *et al.* 2012; D'Alessandro *et al.* 2012a; Ouali *et al.*

2013). Se sabe que tras el proceso *post mortem* de enternecimiento normal de la carne de ternera, subyacen cambios bioquímicos. Sin embargo, cuando los animales sufren PSS, la carne resultante presenta unas características particulares, lo que lleva a suponer que los mecanismos bioquímicos implicados en el proceso de enternecimiento de este tipo de carne, difieren de aquellos que tienen lugar en la carne normal.

En el presente estudio proteómico se pone de manifiesto, por primera vez, que las cadenas ligeras de las miosinas (MYL3 y MYL6B) y las isoformas de la cadena ligera reguladora 2 de la miosina (MYL2 y MYLPF), tienen un rol en el proceso de conversión del músculo LT de bovino en carne DFD, procedente de animales de la raza Rubia Gallega afectados por el PSS. La miosina está formada por dos cadenas pesadas, dos cadenas ligeras y dos cadenas ligeras reguladoras, y es, junto con la actina, la principal proteína estructural del sarcómero. Además, actina y miosina son las proteínas clave del aparato contráctil, ya que su interacción es la responsable de la capacidad del músculo para contraerse (Lawrie 1998; Warriss 2000). Si tenemos en cuenta esto, la implicación de la miosina en el proceso de conversión del músculo en carne no parece un hecho sorprendente. Todas las proteínas identificadas como cadenas ligeras o cadenas ligeras reguladoras de la miosina, formaron parte de una misma red de interacción, al emplear la base de datos STRING v9.1. Las isoformas de las cadenas ligeras de la miosina, MYL3, MYL6B y MYL2, desempeñan un papel importante en cuanto a estructura y función, ya que dan soporte a la estructura de la región del cuello de la miosina y afinan la cinética de las interacciones entre actina y miosina (Doroszko *et al.* 2010). Además, los niveles de MYL3, MYL6B y MYL2 fueron más bajos en carne DFD que en carne control o normal, probablemente debido a una degradación enzimática más intensa de la estructura miofibrilar. La degradación de las cadenas ligeras de la miosina durante las primeras 24 h *post mortem* puede debilitar la fuerza de unión de la actina a la miosina durante la fase de *rigor mortis*, lo cual concuerda con el aumento en la terneza en carne DFD, en comparación con la carne normal (Anderson *et al.* 2012). Durante el proceso de conversión del músculo en carne, el sarcómero se contrae tanto longitudinal como lateralmente. Estudios previos han revelado que la desnaturalización de las cabezas de la miosina contribuye a la contracción lateral del sarcómero, disminuyendo la capacidad de retención de agua o WHC. Además, la desnaturalización de la miosina reduce su habilidad para retener el agua que tenía unida, lo cual también contribuye a reducir la WHC (Pearce *et al.* 2011). La MYL2 presenta una función reguladora de la contracción de las miofibrillas,

mediante Ca^{2+} y la miosina cadena ligera kinasa dependiente de calmodulina. Niveles más bajos de MYL2 en carne DFD pueden contribuir a una reducción del acortamiento del sarcómero, aumentando la WHC en este tipo de carne. Sin embargo, en este estudio, hemos encontrado que dos isoformas de la cadena ligera reguladora 2 de la miosina del músculo esquelético (i.e. las dos isoformas identificadas como MYLPF), sufrieron el cambio relativo más intenso en relación al PSS ($RC_{MYLPF} = +0,475$ y $RC_{MYLPF-1} = +1,0$). Ambas isoformas estaban presentes únicamente en carne DFD. Estos resultados sugieren que estas isoformas de MYLPF son los marcadores más específicos y sensibles para el PSS en el músculo LT de Rubia Gallega.

Nuestras observaciones mostraron un decremento en la abundancia de la proteína TNNC2 en las muestras de carne DFD, lo cual contribuye a explicar la mayor terniza en este tipo de carne. La TNNC, junto con la troponina T (TNNT) y la troponina I (TNNI) constituyen el complejo regulador de troponina, el cual forma parte, junto con la actina, de los miofilamentos finos. El complejo regulador de la troponina es crucial en la contracción del músculo esquelético y cardíaco (Pearson 1989). La TNNT tiene una función estructural, sirviendo de unión a la TNNI y a la TNNC. La función de TNNI es la de inhibir a la actomiosina-ATPasa. Finalmente, la TNNC une los iones de calcio, lo cual provoca un desplazamiento de las tres subunidades de troponina y, de este modo, suprime la acción inhibitoria que el complejo de troponina ejerce sobre la actina, permitiendo la unión de la miosina a la actina y, con ello, la contracción muscular. Cuando la concentración de iones calcio revierte a niveles normales, el complejo de la troponina recupera su posición inicial, se reestablece la acción inhibitoria sobre la actina y la contracción muscular cesa (Warriss 2000). Estudios previos en bovino, han demostrado que la degradación progresiva de la TNNT durante el proceso normal de conversión del músculo en carne, mostraba una correlación directa con la terniza de la carne. De esta manera, la pérdida de TNNT se ha propuesto como medida del grado de proteólisis y, por tanto, como marcador de terniza (Penny & Dransfiel 1979).

Otra de las proteínas estructurales-contráctiles que se reveló que participa en el proceso de conversión del músculo en carne DFD, fue la CFL2, isoforma muscular de la cofilina. Esta presentó un incremento en el volumen en respuesta al PSS. La cofilina es una isoforma perteneciente a la familia del factor de despolimerización de la actina, que participa en la

regulación del citoesqueleto de actina (Munsie *et al.* 2012). La cofilina tiene la capacidad de unirse tanto a la G-actina como a la F-actina, en un ratio 1:1 actina-cofilina, formando los filamentos de cofilina-actina, tanto intranucleares como citoplasmáticos. La CFL2 es específica del músculo y se localiza en los filamentos finos del citoesqueleto, en citoplasma y núcleo. La CFL2 controla el proceso de polimerización/despolimerización de la actina, el cual es sensible al pH. El máximo nivel de despolimerización se da a pH 8,0. Sin embargo, a pH < 7,0 la despolimerización está prácticamente inhibida (Papalouka *et al.* 2009). En el proceso de acidificación normal de la carne, donde el pH cae de 7,0 a 5,5 debido a la acumulación de ácido láctico, la polimerización de la actina se vería favorecida y, con ella, la contracción del sarcómero. Sin embargo, en carne DFD, donde el pH es superior a 6,0, es la despolimerización de la actina dependiente de cofilina la que se vería favorecida, contribuyendo a mejorar la WHC y la terneza.

Las proteínas no estructurales también influyen en el proceso de enternecimiento de la carne en relación con el estrés, en bovino. Existen estudios que, usando *microarrays* de ADNc y PCR en tiempo real, muestran que ciertos genes implicados en la respuesta inmune y en la regulación del metabolismo están asociados a las variaciones en la terneza inducida por el estrés agudo, en la raza bovina Angus (Zhao *et al.* 2012). En nuestro trabajo, los niveles de una proteína glucolítica, la triosafosfato isomerasa 1 (TPI1), una proteína de la membrana mitocondrial, la subunidad beta de la ATP sintetasa mitocondrial (ATP5B) y una glucosiltransferasa, la alfa-2, 6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1), estaban aumentados en carne DFD, cuando se compararon con carne normal. Niveles elevados de enzimas glucolíticas como la TPI1 se relacionan con la terneza en músculo bovino y porcino (Ouali *et al.* 2013).

La TPI1 es una enzima que cataliza la interconversión de la dihidroxiacetona fosfato en glyceraldehído 3-fosfato. Cabe destacar que la TPI1 y la CFL2 formaron parte de una pequeña red de interacción independiente obtenida mediante la base de datos STRING v9.1. Además, ambas proteínas presentaron unos valores de *RC* similares ($RC_{TPI1} = +0,1$ y $RC_{CFL2} = +0,124$). La producción de ATP vía glucólisis anaerobia se traduce en una acumulación de lactato e hidrogeniones en el músculo *post mortem*, al haberse detenido la circulación sanguínea. Como ya se ha explicado anteriormente, la acumulación de hidrogeniones reduce la repulsión electrostática entre las proteínas miofibrilares, lo cual contribuye a la contracción lateral del sarcómero. Los niveles aumentados de TPI1 y CFL2 en carne DFD, pueden afectar a la

concentración intracelular de sodio y a la osmolalidad, favoreciendo la WHC y la terneza en este tipo de carne. Se sabe que en el músculo, la producción de ATP vía glucólisis, sostiene el consumo del mismo por las bombas de la membrana plasmática, tales como la ATPasa Na^+/K^+ (Clarke & Masters 1975; Campbell & Paul 1992; Cantiello 1995). De hecho, se ha descrito la interacción entre un complejo formado por la cofilina-1 fosforilada, isoforma no muscular de la CFL2 y la TPI1, con la bomba Na^+/K^+ , que proporciona ATP a esta última (Jung *et al.* 2002).

5.2. CAMBIOS EN EL MAPA FOSFOPROTEÓMICO DEL MÚSCULO LT BOVINO EN RESPUESTA PSS

El presente estudio revela que el PSS induce cambios destacables en el fosfoproteoma del músculo LT bovino. El nivel global de fosforilación de las proteínas reveladas en los geles 2-DE, fue alrededor de tres veces mayor en las muestras de carne DFD con respecto a las muestras de carne normal. Además, la mayor parte de los *spots* de proteína que presentaban diferencias en el estatus de fosforilación, eran *spots* únicos de carne control o DFD. De este modo, se identificaron un total de 32 *spots* de proteína con diferencias significativas en el grado de fosforilación, que contenían un total de 13 proteínas no redundantes. Por tanto, la variación en el nivel global de fosforilación entre los dos tipos de carne fue notablemente mayor que los cambios en el volumen de las proteínas en respuesta al PSS, observados en la primera parte de este trabajo, donde el total de proteínas que presentaron diferencias significativas en el volumen entre muestras de carne normal y DFD fue de 10.

La gran mayoría de las proteínas con diferencias en el nivel de fosforilación entre los grupos de muestra, formaron parte de una única red de interacción obtenida mediante la base de datos STRING v10.5, incluyendo funciones relacionadas con la contracción muscular, la polimerización de la actina, la glucólisis, el transporte de electrones y la respuesta al estrés. Estos resultados sugieren que la fosforilación reversible de unas pocas proteínas puede dar lugar a una modificación rápida y extensiva del proteoma del músculo LT, en respuesta al PSS. Así, la actina (ACTA1) y la cadena ligera reguladora de la miosina (MYLPF) parecen jugar un papel central en la red de interacción entre fosfoproteínas, ya que son las dos proteínas de conexión entre las fosfoproteínas estructurales-contráctiles y el resto de las fosfoproteínas musculares que formaron parte del interactoma. En concreto, la proteína ACTA1 es la que conecta con el mayor número de proteínas del interactoma, lo que sugiere

que podría jugar un papel clave en la respuesta al PSS. La actina puede encontrarse como moléculas globulares conocidas como G-actina, o en forma de polímeros, formando filamentos, lo que se conoce como F-actina. La actina es, junto con la miosina, la principal proteína muscular, fundamental para la contracción muscular (Lawrie 1998; Warriss 2000). La mayoría de las isoformas fosforiladas de ACTA1 [ACTA1 (3-7)] identificadas en este estudio, estaban presentes exclusivamente en carne control, de menor terneza. En concordancia con estos resultados, varios estudios han asociado la fosforilación de ACTA1 con un decremento en la terneza de la carne bovina (D'Alessandro *et al.* 2012a; de Souza Rodrigues *et al.* 2017). Esta relación puede explicarse considerando que la fosforilación de ACTA1 inhibe la activación de la caspasa 3, deteniendo la ruta hacia la apoptosis (D'Alessandro *et al.* 2012a). Asimismo, Li *et al.* (2017) descubrieron que la fosforilación de ACTA1 mediante la proteína kinasa A, impide su degradación por parte de las μ -calpaínas. Además, estudios previos propusieron que la actividad temprana de algunas proteasas como las μ -calpaínas o el proteosoma 20, era responsable de un mayor grado de proteólisis en carne bovina con un pH_u más alto (Lomiwes *et al.* 2014).

Las isoformas de la cadena ligera reguladora 2 de la miosina [MYL2 (1-2) y MYLPF (1-2)] mostraron patrones de fosforilación opuestos en carne control y DFD. Así, los niveles de fosforilación de las isoformas de MYL2 fueron mayores en carne normal, la cual es menos tierna en comparación con aquella DFD. La fosforilación reversible de MYLPF regula la actividad de la miosina. La fosforilación-defosforilación de MYLPF es llevada a cabo por la acción opuesta de la miosina cadena ligera kinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina y de la fosfatasa tipo 1 (Sweeney *et al.* 1993; Takashima *et al.* 2009, Stull *et al.* 2011). En el músculo *post mortem*, la fosforilación de la proteína MYL2 mediante la miosina cadena ligera kinasa, depende de la concentración de Ca^{2+} que es liberado del retículo sarcoplasmático (Muroya *et al.* 2007; Stull *et al.* 2011). Diversos estudios han evidenciado que durante el *rigor mortis* tiene lugar la fosforilación de MYL2 y que, además, el nivel de fosforilación aumenta a las 24 h *post mortem* en carne bovina, porcina y ovina (Muroya *et al.* 2007; Huang *et al.* 2012; 2014; Chen *et al.* 2016). De este modo, es de suponer que la fosforilación de MYL2 está implicada en el desarrollo del *rigor mortis*. Además, el grado de fosforilación de MYLPF está directamente relacionado con la fuerza de contracción de las fibras de contracción rápida tipo IIb, así como con el grado de dureza de la carne (Ryder *et al.* 2007; Chen *et al.* 2016; Lana *et al.* 2016). Sin embargo, las dos isoformas de MYLPF identificadas en este estudio, mostraron

un patrón de fosforilación contrario a MYL2, ya que únicamente se identificaron en carne DFD. Además, las dos isoformas de MYLPF presentaron el mayor nivel de fosforilación ($PR > 90\%$) de entre todas las proteínas identificadas en este estudio. Estos resultados sugieren que las rutas normales de fosforilación de MYLPF durante el proceso de maduración de la carne, pueden verse alteradas en respuesta al PSS. Las isoformas de MYLPF (1-2) parecen ser los biomarcadores más importantes de PSS, ya que no solo mostraron el mayor cambio cuantitativo en el grado de fosforilación entre grupos de muestra ($RC > +0,90$), sino que también fueron las que presentaron una diferencia más intensa en el volumen en respuesta al PSS en la primera fase de este trabajo.

En este estudio, encontramos que seis *spots* de proteína identificados como isoformas de la troponina T (TNNT3 y TNNT1) presentaron cambios estadísticamente significativos ($P < 0,05$) en respuesta al PSS. La TNNT forma parte del complejo regulador de troponina, el cual tiene un papel fundamental en el proceso de contracción muscular. Numerosos estudios evidencian que la TNNT es un sustrato importante de las enzimas proteolíticas. Así, se pone de manifiesto una relación entre el grado de degradación de la TNNT y el nivel de enternecimiento de la carne, proponiendo a la TNNT como un biomarcador de la terneza de la carne (Purchas *et al.* 1999; Van Laack *et al.* 2001; Iwanowska *et al.* 2010; Sun *et al.* 2014). Las troponinas del músculo esquelético pueden ser fosforiladas tanto por la proteína kinasa dependiente de AMPc, como por la proteínas kinasa C, lo cual afecta al grado de degradación de la troponina por parte de las μ -calpaínas. Sin embargo, la TNNT únicamente puede ser fosforilada por la proteína kinasa C. La fosforilación de la TNNT por parte de esta kinasa, la hace más susceptible a la degradación por parte de las μ -calpaínas. Esto es debido, probablemente, a una disociación del complejo de las troponinas, causado por la fosforilación (Di Lisa *et al.* 1995). Huff-Lonergan *et al.* (1996) demostraron que la proteólisis *post mortem* mediada por μ -calpaínas está correlacionada positivamente con la terneza, en muestras de carne procedentes del músculo LT de bovino. De acuerdo con esto, la mayoría (83%) de las isoformas de TNNT presentes en este estudio [i.e. TNNT3 (1-4) y TNNT1 (2)] aparecieron fosforiladas únicamente en muestras de carne DFD, de mayor terneza. Así, la presencia de isoformas fosforiladas de TNNT puede entenderse como un marcador de terneza en carne bovina.

Por último, únicamente en las muestras de carne DFD se detectó fosforilación en la proteína CAPZA2 ($RC = +0.77$). La proteína CAPZA2 corresponde a la subunidad alfa-2 de la proteína de caperuza de la actina-F, la cual se une al extremo positivo de los filamentos de actina, a nivel del disco Z, bloqueando, de este modo, la polimerización y despolimerización de la actina (Caldwell *et al.* 1989; Dos Remedios *et al.* 2003). Se ha hipotetizado que la creatina kinasa 2 fosforila a la CAPZA2 a través de la proteína 1 de interacción con la proteína kinasa (CKIP-1). Además, se observó que la adición de CKIP-1 *in vivo*, bloquea la actividad de caperuza de CAPZA2, incrementando el grado de despolimerización de la actina (Canton *et al.* 2005). En consecuencia, un mayor nivel de fosforilación de CAPZA2 en las muestras de carne DFD puede ser resultado de una interacción similar entre proteínas kinasa y CAPZA2, favoreciendo la despolimerización de la actina en este tipo de carne.

Las enzimas metabólicas fosfoglucomutasa 1 (PGM1), β -enolasa (ENO3), creatina kinasa (CKM) y la subunidad 1 del complejo b-c1 del citocromo (UQCRC1), también mostraron diferencias en el grado de fosforilación en respuesta a PSS. Las fosfoproteínas PGM1, ENO3 y UQCRC1 formaron una red independiente al considerar exclusivamente la co-expresión, en la base de datos STRING v10.5. Además, interaccionaron con MYLPF y ACTA1 en el interactoma obtenido mediante la base de datos STRING v10.5. La PGM1 cataliza, de forma reversible, la conversión de la glucosa 1-fosfato a glucosa 6-fosfato, durante los procesos de glucólisis y glucogénesis (de Souza Rodrigues *et al.* 2017). La fosforilación de la PGM1 en la treonina 466, por parte de la kinasa 1 activada por p21, incrementa su actividad enzimática. Así, la fosforilación de la PGM1 puede ocurrir como respuesta a un aumento de la glucogenólisis durante el metabolismo *post mortem* (Gurugaj *et al.* 2001; Longo *et al.* 2015). Sin embargo, un aumento en la glucogenólisis incrementaría el descenso del pH, en discordancia con el mayor nivel de fosforilación de la PGM1 en carne DFD, encontrada en este trabajo. Según un estudio llevado a cabo por Anderson *et al.* (2014), aquella carne más tierna, procedente del músculo *longissimus thoracis et lumborum*, presentaba isoformas con mayor grado de fosforilación de PGM1, que la carne más dura. Ellos hipotetizaron que la fosforilación de PGM1 puede alterar el grado de conversión de la glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato, afectando al nivel de descenso del pH. De esta manera, es posible que la demanda de energía ocasionada como respuesta al PSS genere un aumento en la glucogenólisis, provocando un incremento en el nivel de fosforilación de PGM1 en carne DFD. Al contrario, D'Alessandro *et al.* (2012a) propusieron que la fosforilación de PGM1 en

distintos sitios de fosforilación, podría inhibir la actividad de esta enzima, al impedir el acceso a otras kinasas.

En cuanto a las enzimas ENO3 y CKM, todas las isoformas fosforiladas presentes en este estudio se identificaron únicamente en carne DFD. Estos resultados concuerdan con estudios previos, donde se detectaron niveles más altos de fosforilación de estas proteínas en carne porcina con un ritmo de descenso del pH más lento (Huang *et al.* 2011; Li *et al.* 2015). La β -enolasa es una enzima que cataliza la conversión de 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato (Nettelblad & Engström 1987). Se ha demostrado que la fosforilación de la β -enolasa incrementa la actividad de la enzima y, con ello, la síntesis de fosfoenolpiruvato (Nettelblad & Engström 1987). Así, es posible hipotetizar que la fosforilación de ENO3 en muestras de carne DFD, tenga lugar como repuesta a una elevada demanda energética inducida por el PSS.

En cuanto a la CKM, es una enzima que cataliza la interconversión de fosfocreatina y ADP a creatina y ATP (Cruzen *et al.* 2015). Estudios previos han evidenciado que la fosforilación de CKM por parte de la proteína kinasa activada por AMP (AMPK) inhibe su actividad (Ponticos *et al.* 1998; Lin *et al.* 2009). Además, Ponticos *et al.* (1998) mostraron que la AMPK se activa al disminuir la ratio fosfocreatina:creatina. Las contracciones musculares de larga duración o las situaciones extremas, generan una demanda continuada de ATP. Bajo estas condiciones, la concentración de fosfocreatina disminuye radicalmente. Como resultado, la ratio fosfocreatina:creatina se ve reducida y la AMPK se activa, asegurando así que la concentración de ATP sea suficiente para sostener la contracción muscular (Ponticos *et al.* 1998). En esta línea, el aumento de la contracción muscular causada por el PSS podría conllevar al aumento en los niveles de fosforilación de la CKM.

Finalmente, la fosforilación del UQCRC1 únicamente se identificó en carne control. El UQCRC1 es una subunidad del complejo b-c1 del citocromo (o complejo III), de la cadena respiratoria, encargado de transportar los electrones del ubiquinol al citocromo c (Saraste 1999; Zhu *et al.* 2012). La escisión del citocromo b-c1 mediada por la caspasa 3 promueve la desestabilización mitocondrial, dando lugar a la liberación del citocromo c y, subsecuentemente, a la apoptosis (Zhu *et al.* 2012). Estudios previos han revelado que la fosforilación de algunas proteínas evita su ruptura mediada por caspasas e inhibe el desarrollo de la apoptosis (Desagher *et al.* 2001; Fluhrer *et al.* 2004; Schweigreiter *et al.* 2007). De este

modo, la fosforilación del UQCRC1 podría ayudar a comprender que la carne normal sea menos tierna que la DFD, a 24 h *post mortem*.

En este estudio, las proteínas de choque térmico pequeñas (sHSP) HSPB1 y HSPB6 presentaron diferencias en el nivel de fosforilación entre carne DFD y normal. Estudios previos detectaron un incremento de isoformas de HSPs en carne DFD de bovino (Fuente-García *et al.* 2018). La HSPB1 (o HSP27) es una proteína implicada en la respuesta al estrés, la estabilidad de la actina y en las rutas de señalización de la apoptosis (Mymrikov *et al.* 2011; Huang *et al.* 2014). Herrera-Mendez *et al.* (2006) propusieron que una sobreabundancia de sHSP en el momento de la muerte celular programada, podría ejercer una función protectora sobre las proteínas estructurales, debido a su actividad antiapoptótica. La sobreabundancia de sHSP podría retrasar las rutas de señalización hacia la apoptosis mediante distintas acciones, como inhibir la actividad de las caspasas y otros sistemas proteolíticos. Por el contrario, niveles bajos de HSPB1 favorecen la desorganización y degradación de la actina, lo cual se traduce en la desestabilización de la estructura miofibrilar, incrementando la terneza de la carne. Existen evidencias experimentales que apoyan la existencia de una relación entre la concentración de HSPB1 y el nivel de degradación de la actina, con el grado de terneza del músculo bovino (Kim *et al.* 2008; Morzel *et al.* 2008; Guillermin *et al.* 2009; Laville *et al.* 2009). Sin embargo, la relación entre la abundancia de HSPB1 y la textura de la carne es controvertida, ya que la disminución en la concentración de HSPB1 se ha asociado tanto con el aumento (Guillermin *et al.* 2009; Laville *et al.* 2009) como con el decremento (Kim *et al.* 2008; Morzel *et al.* 2008) de la terneza. No obstante, hay que destacar que el papel antiapoptótico de HSPB1 no depende exclusivamente de la concentración de esta proteína, sino que también se ve afectado por el grado de fosforilación de la misma (Mymrikov *et al.* 2011). Cuando HSPB1 se encuentra en un estado desfosforilado, es capaz de inhibir la polimerización de la actina (Miron *et al.* 1991). Por el contrario, la fosforilación de HSPB1 inducida por estrés, acaba con el efecto inhibitorio sobre la polimerización de la actina, contribuyendo a mantener la estabilidad de la actina y, con ello, la estabilidad de la red de microfilamentos (Benndorf *et al.* 1994; Guay *et al.* 1997). En el presente estudio se han encontrado isoformas de HSPB1 diferencialmente fosforiladas en carne control y DFD, lo cual contribuiría a explicar las diferencias de terneza entre los dos grupos de muestra.

La presencia de isoformas fosforiladas de HSPB6 (o HSP20) solo se ha detectado en carne control, menos tierna, en este estudio. Así, el efecto de HSPB1 sobre la terneza de la carne puede verse influido por la fosforilación de HSPB6. Se ha demostrado que cuando está fosforilada, HSPB6 interacciona con proteína 14-3-3, impidiendo la interacción de la cofilina fosforilada con la 14-3-3, que induce la fragmentación y despolimerización de los filamentos de actina (Mymrikov *et al.* 2011).

5.3. COMPARACIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL MAPA PROTEÓMICO Y FOSFOPROTEÓMICO DEL MÚSCULO LT BOVINO EN RESPUESTA PSS

Al realizar un análisis conjunto de los cambios que tienen lugar en los perfiles proteómico y fosfoproteómico del músculo LT bovino, en respuesta al PSS, se observa que únicamente ciertas proteínas con funciones estructurales-contráctiles presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en respuesta al PSS, en ambos casos. En concreto, las proteínas identificadas como cadena ligera de la miosina (MYL6B), cadenas ligeras reguladoras de la miosina (MYL2 y MYLPF) y las proteínas del complejo regulador de la troponina (TNNC2 y TNNT) presentaron cambios tanto en el volumen como en el grado de fosforilación entre grupos de muestras. Todas estas proteínas formaron parte de una misma red de interacción al usar la base de datos STRING v9.1 y v10.5.

La miosina es, además de la actina, la principal proteína del aparato contráctil del músculo (Lawrie 1998; Warriss 2000). Los niveles de MYL6B y MYL2 fueron más bajos en carne DFD que en carne control. Además, el grado de fosforilación de estas proteínas también fue menor en carne DFD que en carne normal. Como se ha explicado anteriormente, la cadena ligera reguladora de la miosina es fosforilada por la miosina cadena ligera proteína kinasa (Sweeney *et al.* 1993). Esta kinasa es Ca^{2+} /calmodulina dependiente, de modo que se activa con la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático. Además, se ha demostrado que la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina incrementa la interacción entre miosina y actina (Sweeney *et al.* 1993; Muroya *et al.* 2007; Stull *et al.* 2011). De este modo, la presencia de isoformas de la cadena ligera reguladora de la miosina con un nivel de fosforilación más bajo, significaría un decremento de las interacciones entre actina y miosina en carne DFD. Esto podría estar facilitando el acceso a ciertas proteasas, aumentando, así, el grado de degradación tanto de las isoformas de MYL2 como de MYL6B en este tipo de carne, y, de esta forma, ser la causa de la disminución en volumen de MYL2 y MYL6B en carne

DFD, en comparación con carne control. Sin embargo, es remarcable que las isoformas de MYLPF presentaron un comportamiento opuesto al resto de las isoformas de la cadena ligera reguladora de la miosina. Las isoformas de MYLPF resultaron ser *spots* de proteína únicos de carne DFD, con los niveles de RC más altos del estudio ($RC_{MYLPF(1)} = +0,475$ y $RC_{MYLPF(2)} = +1,0$). Además, de todas las proteínas identificadas en este trabajo, también fueron las que presentaron los niveles más altos de fosforilación ($PR_{MYLPF(1)} = 0.93 \pm 0.05$ y $PR_{MYLPF(2)} = 0,94 \pm 0.04$). Estos resultados sugieren una posible alteración de las rutas normales de fosforilación y degradación de MYLPF, en respuesta al PSS. De esta manera, las isoformas de MYLPF se proponen como los biomarcadores más importantes de PSS, en el músculo LT de la raza Rubia Gallega.

En este estudio, dos isoformas de la troponina presentaron cambios tanto en el volumen como en el nivel de fosforilación, en respuesta al PSS. Hemos encontrado que la proteína TNNC2 solo estaba presente en carne control. Por otro lado, TNNT mostró un nivel más elevado de fosforilación en carne DFD. Ambas proteínas forman parte, junto con la TNNI, del complejo regulador de la troponina, el cual ejerce una acción inhibitoria sobre la actina, permitiendo o impidiendo la contracción muscular (Pearson 1989). TNNT tiene una función estructural, ya que sirve de anclaje a TNNI y TNNC. Se ha demostrado que la fosforilación de TNNT por parte de la proteína kinasa C, hace a esta proteína más susceptible a la degradación por parte de las μ -calpaínas, probablemente debido a que esta fosforilación causa la disociación del complejo de las troponinas (Di Lisa *et al.* 1995). Por consiguiente, es posible que la fosforilación de TNNT en carne DFD, promueva su degradación, eliminando el punto de unión de la TNNC y la TNNI y provocando, así, la disgregación del complejo de las troponinas. De esta manera, la TNNC sería más susceptible a ser degradada por las calpaínas u otras proteasas, explicando los niveles tan bajos de esta proteína en carne DFD, hallados en este estudio.

Conjuntamente, el grado de despolimerización de la actina parece jugar un papel clave en los niveles de terneza de la carne DFD. En este estudio se ha encontrado que la cantidad de CFL2 era mayor en la carne DFD, procedente del músculo bovino LT. La CFL2, isoforma muscular de la cofilina, regula, de manera dependiente de pH, el proceso de polimerización/despolimerización de la actina. La despolimerización de la actina por parte de la CFL2, se ve prácticamente inhibida a $pH < 7$ (Papalouka *et al.* 2009). De esta manera, en

carne DFD, de pH_u próximo a 7, la despolimerización de la actina se vería favorecida, incrementando la ternura en este tipo de carne. Asimismo, la presencia de isoformas fosforiladas de CAPZA2 en carne DFD, estaría favoreciendo la despolimerización de la actina. Se ha hipotetizado que la fosforilación de CAPZA2 por medio de la creatina kinasa 2 y CKIP-1 bloquea su actividad de caperuza, favoreciendo la despolimerización de la actina (Canton *et al.* 2005). En concordancia con estos resultados, la mayoría de isoformas fosforiladas de ACTA1 se detectaron en carne control, en este trabajo. La fosforilación de ACTA1 por parte de la proteína kinasa A, previene su degradación por parte de las μ -calpaínas (Li *et al.* 2017). Además, la presencia de isoformas fosforiladas de la proteína HSPB6 únicamente en carne control, mantienen la estabilidad de los filamentos de actina en este tipo de carne, ya que la HSPB6 fosforilada impide la fragmentación y despolimerización de los filamentos de actina al bloquear la interacción de la cofilina fosforilada con la 14-3-3 (Mymrikov *et al.* 2011).





CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

1. El presente estudio pone de manifiesto, por primera vez, que el proteoma del músculo *longissimus thoracis* (LT) de bovino, específicamente de la raza Rubia Gallega, sufre cambios importantes en respuesta al estrés pre-sacrificio (PSS). Concretamente, un total de 7 proteínas con funciones estructurales-contráctiles (tres isoformas de la cadena ligera de la miosina, dos isoformas de la cadena ligera reguladora 2 de la miosina, la troponina C tipo 2 y la cofilina 2) y tres enzimas metabólicas (triosafosfato isomerasa, la subunidad beta de la ATP sintetasa, beta-galactosidasa alfa-2,6-sialiltransferasa) mostraron diferencias estadísticamente significativas en el volumen, entre los grupos de muestra DFD y control.
2. Los cambios más intensos se observaron en un grupo de proteínas con funciones estructurales-contráctiles que interactúan funcionalmente y comprenden diferentes isoformas de la cadena ligera y cadena ligera reguladora 2 de la miosina y la troponina C tipo 2.
3. Los resultados sugieren que la nueva medida de cambio relativo (*RC*, *relative change*) propuesta en este trabajo es más eficiente que la medida tradicional de “*fold change*”, para comparar las diferencias en volumen de los *spots* proteicos, entre grupos de muestra.
4. Las proteínas que experimentaron un cambio significativo en volumen entre las muestras control y DFD, contribuyen a una mejor comprensión de las características de la carne procedente de animales afectados por el PSS, como son una mayor terniza o el incremento en la capacidad de retención de agua (WHC).
5. En este estudio se revela que los cambios en el proteoma del músculo LT bovino en respuesta al PSS no solo comprenden diferencias a nivel de abundancia proteica, sino también modificaciones postraduccionales por medio de fosforilaciones. Así, este trabajo evidencia, por primera vez, una variación en el fosfoproteoma del músculo LT bovino en respuesta al PSS. En total, 13 proteínas no redundantes presentaron cambios en los niveles de fosforilación entre carne DFD y control incluyendo funciones estructurales-contráctiles (actina, una proteína de caperuza de la actina, dos isoformas de la troponina T, una isoforma de la cadena ligera de la miosina y dos isoformas de la cadena ligera reguladora 2 de la miosina), enzimas metabólicas (la fosfoglucomutasa 1, la β -enolasa y la creatina kinasa), proteínas de respuesta al estrés (isoformas de las proteínas pequeñas de choque térmico) y una proteína de la cadena de transporte de electrones.

6. Los dos *spots* de proteína identificados como MYLPF mostraron el mayor cambio relativo (*RC*) en el grado de fosforilación, entre los grupos de muestras.
7. Los resultados de este trabajo revelan que la fosforilación reversible de las proteínas juega un papel clave en la respuesta al PSS y ayuda a explicar las características de la carne DFD, como por ejemplo, la variación en la ternera.
8. Las isoformas de la cadena ligera de la miosina, las isoformas de la cadena ligera reguladora 2 de la miosina y las isoformas de la troponina, presentaron variaciones tanto en el volumen como en el nivel de fosforilación en respuesta al PSS, por lo que constituyen los biomarcadores más fiables de PSS en la raza bovina Rubia Gallega.



CONCLUSIONS

1. The present study shows, for the first time, that the *longissimus thoracis* (LT) bovine muscle, from the Rubia Gallega breed, undergoes significant changes in response to pre-slaughter stress (PSS). Specifically, a total of 7 structural-contractile proteins (three myosin light chain isoforms, two myosin regulatory light chain 2 isoforms, troponin C type 2 and cofilin-2) and three metabolic enzymes (triosephosphate isomerase, ATP synthase subunit beta and beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1) showed statistically significant differences in volume, between DFD and control sample groups.
2. The most intense changes were observed in a group of functionally interacting structural-contractile proteins, involving myosin light chain and myosin regulatory light chain 2 and troponin C type 2.
3. Our results suggest that new relative change (*RC*) measure proposed in this study is more efficient than traditional fold change measure (*FC*), when comparing protein spot volume differences, between sample groups.
4. Proteins with significant changes in volume between control and DFD meat samples, promote a better understanding of DFD meat characteristics, such as an augmentation in tenderness and water holding capacity (WHC).
5. This study reveals that changes in LT bovine muscle proteome in response to PSS, involve not only differences in protein abundance, but also differences in protein phosphorylation. Thus, this work is a first evidence of a variation in the LT bovine muscle phosphoproteome in response to PSS. A total of 13 non-redundant proteins showed differences in phosphorylation status between DFD and control meats, including structural-contractile functions (actin, actin-capping protein, two isoforms of troponin T, myosin light chain and two isoforms of myosin regulatory light chain 2), metabolic enzymes (phosphoglucumutase 1, β -enolase and creatine kinase), stress response proteins (two isoforms of the small heat shock proteins) and a protein involved in the electron transport chain.
6. The two protein spots identified as MYLPF showed the highest relative change (*RC*) in phosphorylation levels, between sample groups.

7. Our results revealed that reversible protein phosphorylation has a key role in the response to PSS and aids to explain DFD meat characteristics, such as tenderness variation.

8. In this study, myosin light chain isoforms, fast skeletal myosin regulatory light chain 2 and troponin isoforms, showed significant variations both in volume and in phosphorylation levels. Hence, these proteins constitute the most reliable biomarkers of PSS response in Rubia Gallega bovine breed.





BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- Abril, M., Campo, M. M., Önenç, A., Sañudo, C., Albertí, P., Negueruela, A. I. (2001). Beef color evolution as a function of ultimate pH. *Meat Sci.* 58:69-78.
- Adzitey, F., Nurul, H. (2011). Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences- a mini review. *Int. Food. Res. J.* 18:11-20.
- Agrawal, G. K., Thelen, J. J. (2005) Development of a simplified, economical polyacrylamide gel staining protocol for phosphoproteins. *Proteomics.* 5:4684-8.
- Almeida, A. M., Campos, A., van Harten, S., Cardoso, L. A., Coelho, A. V. (2009). Establishment of a proteomic reference map for the gastrocnemius muscle in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Res. Vet. Sci.* 87(2):196-199.
- Almeida, A. M., Nanni, P., Ferreira, A. M., Fortes, C., Grossmann, J., Bessa, R. J., Costa, P. (2016). The longissimus thoracis muscle proteome in Alentejana bulls as affected by growth path. *J. Proteomics.* 125:206-215.
- Al-Shahrour, F., Díaz-Uriarte, R., Dopazo, J. (2004). FatiGO: A web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics.* 20:578-80.
- Anderson, M. J., Lonergan, S. M., Huff-Lonergan, E. (2012). Myosin light chain 1 release from myofibrillar fraction during post-mortem aging is a potential indicator of proteolysis and tenderness of beef. *Meat Sci.* 90:345-51.
- Anderson, M. J., Lonergan, S. M., Huff-Lonergan, E. (2014) Differences in phosphorylation of phosphoglucomutase 1 in beef steaks from the longissimus dorsi with high or low star probe values. *Meat Sci.* 96:379-84.
- Bendall, J. R., Taylor, A. A. (1972). Consumption of oxygen by the muscles of beef animals and related species. II. Consumption of oxygen by post-rigor muscle. *J. Sci. Food Agric.* 23(6):707-719.
- Bendixen, E. (2005). The use of proteomics in meat science. *Meat Sci.* 71:138-149.

- Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., Lutsch, G. (1994). Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J. Biol. Chem.* 269:20780-4.
- Bjarnadóttir, S. G., Hollung, K., Færgestad, E. M., Veiseth-Kent, E. (2010). Proteome Changes in Bovine Longissimus Thoracis Muscle during the First 48 h Postmortem: Shifts in Energy Status and Myofibrillar Stability. *J. Agric. Food Chem.* 58:7408-7414.
- Blackstock, W. P., Weir, M. P. (1999). Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17(3):121-127.
- Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. (2004). Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 4(6):1811-1824.
- Bourguet, C., Deiss, V., Gobert, M., Durand, D., Boissy, A., Terlouw, E. M. C. (2010). Characterising the emotional reactivity of cows to understand and predict their stress reactions to the slaughter procedure. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 125:9-21.
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technol.* 32:62-66.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.* 72:248-54.
- Caldwell, J. E., Heiss, S. G., Mermall, V., Cooper, J. A. (1989). Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry.* 28:8506-14.
- Campbell, J. D., Paul, R. J. (1992). The nature of fuel provision for the Na⁺, K⁺-ATPase in porcine vascular smooth muscle. *J. Physiol.* 447:67-82.
- Cantiello, H. F. (1995): Actin filaments stimulate the Na⁺/K⁺-ATPase. *Am. J. Physiol.* 269:F637-43.

- Canton, D. A., Olsten, M. E. K., Kim, K., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., Cooper, J. A., Litchfield, D. W. (2005). The pleckstrin homology domain-containing protein CKIP-1 is involved in regulation of cell morphology and the actin cytoskeleton and interaction with actin capping protein. *Mol. Cell. Biol.* 25:3519-34.
- Carpentier, S. C., Dens, K., Van den houwe, I., Swennen, R., Panis, B. (2007). Lyophilization, a practical way to store and transport tissues prior to protein extraction for 2DE analysis?. *Proteomics*. 7(S1):64-69.
- Chen, L., Li, X., Ni, N., Liu, Y., Chen, L., Wang, Z., Shen, Q. W., Zhang, D. (2016). Phosphorylation of myofibrillar proteins in post-mortem ovine muscle with different tenderness. *J. Sci. Food Agric.* 96:1474-1483.
- Chrousos, G. P. (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: the 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann. NY Acad. Sci.* 851(1):311-335.
- Chulayo, A. Y., Muchenje V. (2016). Effects of animal class and genotype on beef muscle nanostructure, pHu, colour and tenderness. *S. Afr. J. Sci.* 112(7/8):1-9.
- Clarke, F. M., Masters, C. J. (1975). On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 381:37-46.
- Cruzen, S. M., Pearce, S. C., Baumgard, L. H., Gabler, N. K., Huff-Lonergan, E., Lonergan, S. M. (2015). Proteomic changes to the sarcoplasmic fraction of predominantly red or white muscle following acute heat stress. *J. Proteomics*. 128:141-53.
- Cottrell, J. S. (2011). Protein identification using MS/MS data. *J. Proteomics*. 74(10):1842-1851.
- D'Alessandro, A., Marrocco, C., Rinalducci, S., Mirasole, C., Failla, S., Zolla, L. (2012a). Chianina beef tenderness investigated through integrated Omics. *J. Proteomics*. 75(14):4381-4398.
- D'Alessandro, A., Rinalducci, S., Marrocco, C., Zolla, V., Napolitano, F., Zolla, L. (2012b). Love me tender: an Omics window on the bovine meat tenderness network. *J. Proteomics*. 75(14):4360-4380.

- D'Alessandro, A., Zolla, L. (2012c). Food safety and quality control: hints from proteomics. *Food Technol. Biotech.* 50(3):275.
- D'Alessandro, A., Zolla, L. (2013). Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. *J. Proteomics.* 78:559-577.
- de Souza Rodrigues, R. T., Chizzotti, M. L., Vital, C. E., Baracat-Pereira, M. C., Barros, E., Busato, K. C., Gomes, R. A., Ladeira, M. M., da Silva Martins, T. (2017). Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. *PloS one.* 12(1):e0170294.
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., Martinou, J.-C. (2001). Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell.* 8:601-11.
- Doroszko, A., Polewicz, D., Cadete, V. J., Sawicka, J., Jones, M., Szczesna-Cordary, D., Cheung, P.-Y., Sawicki, G. (2010). Neonatal asphyxia induces the nitration of cardiac myosin light chain 2 (MLC2) which is associated with cardiac systolic dysfunction. *Shock (Augusta, Ga.).* 34(6):592.
- Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83:433-73.
- Efron, B. (1982). The jackknife, the bootstrap and other resampling plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics No. 38. *Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics.*
- El-deeb, W. M., El-Bahr, S. M. (2014). Acute-phase proteins and oxidative stress biomarkers in water buffalo calves subjected to transportation stress. *Com. Clin. Path.* 23(3):577-582.
- Ferguson, D. M., Warner, R. D. (2008). Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Sci.* 80:12-9.

- Fluhrer, R., Friedlein, A., Haass, C., Walter, J. (2004). Phosphorylation of presenilin 1 at the caspase recognition site regulates its proteolytic processing and the progression of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279:1585-93.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovis, M., Roth, A., Lin, J., Minguez, P., Bork, P., von Mering, C., Jensen, L. J. (2013). STRING v9.1: protein-protein interaction networks with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 41:D808-15.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F. J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo S, Parrado, M., Gallardo, J. M., Zapata, C. (2015a). Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. *J. Proteomics.* 122:73-85.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F. J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., Parrado, M., Gallardo, J. M., Zapata, C. (2015b). Quantification of proteome changes in bovine muscle from two-dimensional electrophoresis data. *Data Brief.* 4:100-4.
- Frylinck, L., Strydom, P. E., Webb, E. C., du Toit, E. (2013). Effect of South African beef production systems on post-mortem muscle energy status and meat quality. *Meat Sci.* 93:827-37.
- Geesink, G. H., Koohmaraie, M. (1999). Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *J. Anim. Sci.* 77:2685-92.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 21:1037-53.
- Grandin, T. (1997). Assessment of stress during handling and transport. *J. Anim. Sci.* 75:249-75.
- Graves, J. D., Krebs, E. G. (1999). Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol. therapeut.* 82(2-3):111-121.
- Gregory, N. G., Grandin, T. (1998). Animal welfare and meat science. *Wallingford: CABI Publishing.*

- Guay, J., Lambert, H., Gringas-Breton, G., Lavoie, J. N., Huot, J., Landry, J. (1997). Regulation of actin filament dynamics by p38 kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell. Sci.* 110:357-68.
- Guillermin, N., Bonnet, M., Jurie, C., Picard, B. (2011). Functional analysis of beef tenderness. *J. Proteomics*.75:352-65.
- Guillermin, N., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Jurie, C., Micol, D., Listrat, A., Leveziel, H., Renand, G., Picard, B. (2009). La maîtrise de la tendreté de la viande bovine : identification de marqueurs biologiques. *INRA Prod. Anim.* 22:331-4.
- Gururaj, A., Barnes, C. J., Vadlamudi, R. K., Kumar, R. (2004). Regulation of phosphoglucomutase 1 phosphorylation and activity by a signaling kinase. *Oncogene*. 23:8118.
- Healthcare, G. E. (2004). Handbook: 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients, principles & methods. *Piscataway: GE Healthcare*.
- Herrera-Mendez, C., Becila, S., Boudjellal, A., Ouali, A. (2006). Meat ageing: reconsideration of the current concept. *Trends Food Sci. Technol.* 17:394-405.
- Hollung, K., Veiseth, E., Jia, X., Færgestad, E. M., Hildrum, K. I. (2007). Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. *Meat Sci.* 77:97-104.
- Houbak, M. B., Ertbjerg, P., Therkildsen, M. (2008). In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and μ -calpain. *Meat Sci.* 79(1):77-85.
- Huang, H., Larse, M. R., Karlsson, A. H., Pomponio, L., Costa, L. N., Lametsch, R. (2011). Gel-based phosphoproteomics analysis of sarcoplasmic proteins in post-mortem porcine muscle with pH decline rate and time differences. *Proteomics*. 11:4063-4076.
- Huang, H., Larsen, M. R., Lametsch, R. (2012). Changes in phosphorylation of myofibrillar proteins during postmortem development of porcine muscle. *Food chem.* 134(4):1999-2006.

- Huang, H., Larsen, M. R., Palmisano, G., Dai, J., Lametsch, R. (2014). Quantitative phosphoproteomic analysis of porcine muscle within 24 h postmortem. *J. Proteomics*. 106:125-139.
- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Beekman, D. D., Parrish Jr., F. C., Olson, D. G., Robson, R. M. (1996). Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J. Animal Sci.* 74:993-1008.
- Iwanowska, A., Iwanska, E., Grzes, B., Mikolajczak, B., Pospiech, E., Rosochacki, S., Juszcuk-Kubiak, E., Łyczyński, A. (2010). Changes in proteins and tenderness of meat from young bulls of four breeds at three ages over 10 days of cold storage. *Anim. Sci. Paper Rep.* 28:13-25.
- Jeleníková, J., Pipek, P., Staruch, L. (2008). The influence of ante-mortem treatment on relationship between pH and tenderness of beef. *Meat Sci.* 80:870-874.
- Jensen, O. N., Wilm, M., Shevchenko, A., Mann, M. (1999). Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. *Methods Mol. Biol.* 112:513-30.
- Jia, X., Ekman, M., Grove, H., Færgestad, E. M., Aass, L., Hildrum, K. I., Hollung, K. (2007). Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. *J. Proteome Res.* 6(7):2720-2731.
- Joseph, P., Suman, S. P., Rentfrow, G., Li, S., Beach, C. M. (2012). Proteomics of muscle-specific beef color stability. *J. Agr. Food Chem.* 60(12):3196-3203.
- Jung, J., Yoon, T., Choi, E. C., Lee, K. (2002). Interaction of cofilin with triose-phosphate isomerase contributes glycolytic fuel for Na, K-ATPase via Rho-mediated signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 277:48931-7.
- Kim, M. H., Yang, J. Y., Upadhaya, S. D., Lee, H. J., Yun, C. H., Ha, J. K. (2011). The stress of weaning influences serum levels of acute-phase proteins, iron-binding proteins, inflammatory cytokines, cortisol, and leukocyte subsets in Holstein calves. *J. Vet. Sci.* 12(2): 151-157.

- Kim, N. K., Cho, S., Lee, S. H., Park, H. R., Lee, C. S., Cho, Y. M., Choy, Y. H, Yoon, D., Im, S. K., Park, E. W. (2008). Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Sci.* 80:1068-1073.
- Lametsch, R., Karlsson, A., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Roepstorff, P., Bendixen, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *J. Agr. Food Chem.* 51(24):6992-6997.
- Lana, A., Zolla, L. (2016). Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. *J. Proteomics.* 147: 85-97.
- Laville, E., Sayd, T., Morzel, M., Blinet, S., Chambon, C., Lepetit, J., Renand, G., Hocquette, J. F. (2009). Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. *J. Agric. Food. Chem.* 57(22):10755-10764.
- Lawrie, R. A. (1998). Lawrie's meat science. *Cambridge: Woodhead Publishing Limited.*
- Li, C., Zhou, G., Xu, X., Lundström, K., Karlsson, A., Lametsch, R. (2015). Phosphoproteome analysis of sarcoplasmic and myofibrillar proteins in bovine longissimus muscle in response to postmortem electrical stimulation. *Food Chem.* 175:197-202.
- Li, M., Li, X., Xin, J., Li, Z., Li, G., Zhang, Y., Du, M., Shen, Q. W., Zhang, D. (2017a). Effects of protein phosphorylation on color stability of ground meat. *Food Chem.* 219:304-310.
- Li, M., Li, Z., Li, X., Xin, J., Wang, Y., Li, G., Wu, L., Shen, Q. W., Zhang, D. (2018a). Comparative profiling of sarcoplasmic phosphoproteins in ovine muscle with different color stability. *Food Chem.* 240:104-111.
- Li, X., Xia, A.-Q., Chen, L.-J., Du, M.-T., Chen, L., Kan, N., Zhang, D.-Q. (2018b). Effects of lairage after 694 transport on post-mortem muscle glycolysis, protein phosphorylation and lamb meat 695 quality. *J. Integr. Agr.* 17:2336-44.

- Li, Z., Li, M., Li, X., Xin, J., Wang, Y., Shen, Q. W., Zhang, D. (2018c). Quantitative phosphoproteomic analysis among muscles of different color stability using tandem mass tag labeling. *Food Chem.* 249:8-15.
- Li, Z., Li, X., Gao, X., Shen, Q. W., Du, M., Zhang, D. (2017b). Phosphorylation prevents in vitro myofibrillar proteins degradation by μ -calpain. *Food Chem.* 218: 455-462.
- Lin, G., Liu, Y., MacLeod, K. M. (2009). Regulation of muscle creatine kinase by phosphorylation in normal and diabetic hearts. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:135.
- Liu, M., Wei, Y., Li, X., Quek, S. Y., Zhao, J., Zhong, H., Zhang, D., Liu, Y. (2018). Quantitative phosphoproteomic analysis of caprine muscle with high and low meat quality. *Meat Sci.* 141:103-111.
- Lomborg, S. R., Nielsen, L. R., Heegaard, P. M., Jacobsen, S. (2008). Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Vet. res. commu.* 32(7):575-582.
- Lomiwes, D., Farouk, M. M., Wu, G., Young, O. A. (2014). The development of meat tenderness is likely to be compartmentalised by ultimate pH. *Meat Sci.* 96(1):646-651.
- Lonergan, E. H., Zhang, W., Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of post-mortem muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci.* 86:184-195.
- Longo, V., Lana, A., Bottero, M. T., Zolla, L. (2015). Apoptosis in muscle-to-meat aging process: The omic witness. *J. Proteomics.* 125:29-40.
- López-Pedrouso, M., Alonso, J., Zapata, C. (2014). Evidence for phosphorylation of the major seed storage protein of the common bean and its phosphorylation-dependent degradation during germination. *Plan. Mol. Biol.* 84(4-5):415-428.
- López-Pedrouso, M., Pérez-Santaescolástica, C., Franco, D., Carballo, J., Garcia-Perez, J. V., Benedito, J., Zapata, C., Lorenzo, J. M. (2019a). Proteomic footprint of ultrasound intensification on sliced dry-cured ham subjected to mild thermal conditions. *J. Proteomics.* 193:123-130.
- López-Pedrouso, M., Pérez-Santaescolástica, C., Franco, D., Carballo, J., Zapata, C., Lorenzo, J. M. (2019b). Molecular insight into taste and aroma of sliced dry-cured ham induced

by protein degradation undergone high-pressure conditions. *Food Res. Int.* In press, DOI: 10.1016/j.foodres.2019.01.037.

López-Pedrouso, M., Pérez-Santaescolástica, C., Franco, D., Fulladosa, E., Carballo, J., Zapata, C., Lorenzo, J. M. (2018). Comparative proteomic profiling of myofibrillar proteins in dry-cured ham with different proteolysis indices and adhesiveness. *Food Chem.* 244:238-245.

Maltin, C., Balcerzak, R., Tilley, R., Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *Proc. Nutr. Soc.* 62:337-47.

Mato, A., Rodríguez-Vázquez, R., López-Pedrouso, M., Bravo, S., Franco, D., Zapata, C. (2019). A first evidence of meat phosphoproteome changes in response to acute pre-slaughter stress from longissimus thoracis muscle beef. *BMC Genomics*. Enviado para su publicación.

Mehta-D'souza, P. (2018) Detection of Glycoproteins in Polyacrylamide Gels Using Pro-Q Emerald 300 Dye, a Fluorescent Periodate Schiff-Base Stain. In: Kurien B., Scofield R. Protein Gel Detection and Imaging. *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press.

Miranda-de la Lama, G. C., Villarroel, M., María, G. A. (2014). Livestock transport from the perspective of the pre-slaughter logistic chain: a review. *Meat Sci.* 98:9-20.

Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M., Geiger, B. (1991). A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J. Cell Biol.* 114:255-61.

Møller, A. J. (1981). Analysis of Warner-Bratzler shear pattern with regard to myofibrillar and connective tissue components of tenderness. *Meat Sci.* 5(4):247-260.

Morzel, M., Terlow, C., Chambon, C., Micol, D., Picard, B. (2008). Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of “Blonde d'Aquitaine” young bulls: a central role of HSP27 isoforms. *Meat Sci.* 78:297-304.

- Mounier, L., Dubroeuq, H., Andanson, S., Veissier, I. (2006). Variations in meat pH of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. *J. Anim. Sci.* 84(6): 1567-1576.
- Mouzo, D., Bernal, J., López-Pedrouso, M., Franco, D., Zapata, C. (2018). Advances in the biology of seed and vegetative storage proteins based on two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Molecules*. 23(10):2462.
- Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P. E., Hugo, A., Raats, J. G. (2009). Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. *Food Chem.* 112:279-289.
- Munsie, L. N., Desmond, C. R., Truant, R. (2012). Cofilin nuclear-cytoplasmic shuttling affects cofilin-actin rod formation during stress. *J. Cell Sci.* 125:3977-88.
- Muroya, S., Ohnishi-Kameyama, M., Oe, M., Nakajima, I., Shibata, M., Chikuni, K. (2007). Double phosphorylation of the myosin regulatory light chain during rigor mortis of bovine longissimus muscle. *J. Agric. Food Chem.* 55:3998-4004.
- Mymrikov, E. V., Seit-Nebi, A. S., Gusev, N. B. (2011). Large potential of small heat shock proteins. *Physiol. Rev.* 91:1123-59.
- Nettelblad, F. A., Engström, L. (1987). The kinetic effects of in vitro phosphorylation of rabbit muscle enolase by protein kinase C. *FEBS Lett.* 214:249-52.
- Newton, K. G., Gill, C. O. (1980). The microbiology of DFD fresh meats: review. *Meat Sci.* 5:223-232.
- Ong, S. E., Pandey, A. (2001). An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol. Eng.* 18(5):195-205.
- Ouali, A., Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Boudjellal, A., Herrera-Mendez, C. H., Sentandreu, M. A. (2013). Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. *Meat Sci.* 95: 854-70.

- Papalouka, V., Arvanitis, D. A., Vafiadaki, E., Mavroidis, M., Papadodima, S. A., Spiliopoulou, C. A., Kremastinos, D. T., Kranias, E. G., Sanoudou, D. (2009). Muscle Lim Protein interacts with cofilin 2 and regulates F-actin dynamics in cardiac and skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 29:6046-58.
- Paredi, G., Raboni, S., Bendixen, E., de Almeida, A. M., Mozzarelli, A. (2012). "Muscle to meat" molecular events and technological transformations: the proteomics insight. *J. Proteomics.* 75(14):4275-4289.
- Pathare, P. B., Roskilly, A. P. (2016). Quality and Energy Evaluation in Meat Cooking. *Food Eng. Rev.* 8:435-447.
- Pearce, K. L., Rosenvold, K., Andersen, H. J., Hopkins, D. L. (2011). Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts in fresh meat quality attributes - A review. *Meat Sci.* 89:111-124.
- Pearson, A. M., Young, R. B. Muscle and Meat Biochemistry. *San Diego: Academic Press; 1989.*
- Penny, I. F., Dransfield, E. (1979). Relationship between toughness and troponin T in conditioned beef. *Meat Sci.* 3:135-41.
- Ponticos, M., Lu, Q. L., Morgan, J. E., Hardie, D. G., Partridge, T. A., Carling, D. (1998). Dual regulation of the AM-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J.* 17:1688-99.
- Purchas, R. W., Yan, X., Hartley, D. G. (1999). The influence of period of ageing on the relationship between ultimate pH and shear values of beef M. longissimus thoracis. *Meat Sci.* 51:135-41.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *J. Proteomics.* 73(11):2064-2077.
- Rabilloud, T., Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J. Proteomics.* 74(10):1829-1841.

- Robert, N., Briand, M., Taylor, R., Briand, Y. (1999). The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. *Meat Sci.* 51(2):149-153.
- Romero, M. H., Uribe-Velásquez, L. F., Sánchez, J. A., Rayas-Amor, A. A., Miranda-de la Lama, G. C. (2017). Conventional versus modern abattoirs in Colombia: Impacts on welfare indicators and risk factors for high muscle pH in comercial Zebu Young Bulls. *Meat Sci.* 123: 173-181.
- Ruiz de Huidobro, F., Miguel, E., Blázquez, B., Onega, E. (2005). A comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Sci.* 69:527-536.
- Ryder, J. W., Lau, K. S., Kamm, K. E., Stull, J. T. (2007). Enhanced skeletal muscle contraction with myosin light chain phosphorylation by a calmodulin-sensing kinase. *J. Biol. Chem.* 282:20447-54.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science.* 283:1488-93.
- Schrage, L. (1979). A more portable Fortran random number generator. *ACM Trans .Math. Softw.* 5:132-8.
- Schweigreiter, R., Stasyk, T., Contarini, I., Frauscher, S., Oertle, T., Klimaschewski, L., Huber, L. A., Bandtlow, C. E. (2007). Phosphorylation-regulated cleavage of the reticulon protein Nogo-B by caspase-7 at a noncanonical recognition site. *Proteomics.* 7:4457-67.
- Shibata, M., Matsumoto, K., Oe, M., Ohnishi-Kameyama, M., Ojima, K., Nakajima, I., Muroya, S., Chikuni, K. (2014). Differential expression of the skeletal muscle proteome in grazed cattle. *J. Anim. Sci.* 87:2700-2708.
- Silva, J. A., Patarata, L., Martins, C. (1999). Influence of ultimate pH in bovine meat tenderness during ageing. *Meat Sci.* 52:453-459.
- Smulders, F. J. M. (1986). Sensory meat quality and its assessment. *Vet. Q.* 8:158-167.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (2012). Biometry. *New York: W.H. Freeman and Company.*

- Stull, J. T., Kamm, K. E., Vandenboom, R. (2011). Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 510:120-8.
- Sun, X., Chen, K. J., Berg, E. P., Newman, D. J., Schwartz, C. A., Keller, W. I., Carlin, K. R. M. (2014). Prediction of troponin-T degradation using color image texture features in 10 d aged beef longissimus steaks. *Meat Sci.* 96:837-42.
- Sweeney, H., Bowman, B. F., Stull, J. T. (1993). Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 264:C1085-95.
- Takashima, M. D. (2009). Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. *Circ. J.* 73:208-13.
- Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M., Goll, D. E. (1995). Is Z-disk degeneration responsible for post-mortem tenderization? *J. Anim. Sci.* 73:1351-67.
- Terlouw, E. M. C., Arnould, C., Auperin, B., Berri, C., Le Bihan-Duva, E., Deiss, V., Lefèvre, F., Lensink, B. J., Mounier, L. (2008). Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: Current status and possible future research. *Animal.* 2:1501–17.
- Tornberg, E. (1996). Biophysical Aspects of Meat Tenderness. *Meat Sci.* 43:175-191.
- Tyers, M., Mann, M. (2003). From genomics to proteomics. *Nature.* 422(6928):193.
- Van Laack, R. L. J. M., Stevens, S. G., Stalder, K. J. (2001). The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. *J. Anim. Sci.* 79:392-7.
- Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, N. (1994). Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal. Chem.* 66:3281-87.
- Warriss, P. D. (2000). Meat science: An introductory text. *Wallingford & New York: CABI Publishing.*
- Weiss, W., Görg, A. (2007). Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics. *Methods Mol. Biol.* 355:121-145.

- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.-C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L., Hochstrasser, D. F. (1996). From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Biotechnology (N.Y.)*. 14:61-65.
- Yu, Q., Wu, W., Tian, X., Jia, F., Xu, L., Dai, R., Li, X. (2017). Comparative proteomics to reveal muscle-specific beef color stability of Holstein cattle during post-mortem storage. *Food Chem.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.004>.
- Zanetti, E., Masi, A., Pivato, M., Tolin, S., Trentin, A. R., Guler, C., Yalçın, S., Cassandro, M. (2013). A note on protein expression changes in chicken breast muscle in response to time in transit before slaughtering. *Proteome Sci.* 11(1):34.
- Zapata, I., Zerby, H. N., Wick, M. (2009). Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *J. Agric. Food. Chem.* 57:4956-63.
- Zhang, Z., Wu, S., Stenoien, D. L., Paša-Tolić, L. (2014). High-throughput proteomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 7:427-454.
- Zhao, C., Tian, F., Yu, Y., Luo, J., Mitra, A., Zhan, F., Houm, Y., Liu, G., Zan, L., Updike, M. S., Song, J. (2012). Functional genomic analysis of variation on beef tenderness induced by acute stress in Angus cattle. *Comp. Funct. Genom.* 2012:756284.
- Zhou, X., Ding, Y., Wang, Y. (2012). Proteomics: present and future in fish, shellfish and seafood. *Rev. Aquacult.* 4(1):11-20.
- Zhu, Y., Li, M., Wang, X., Jin, H., Liu, S., Xu, J., Chen, Q. (2012). Caspase cleavage of cytochrome c1 disrupts mitochondrial function and enhances cytochrome c release. *Cell Res.* 22:127.
- Zuo, H., Han, L., Yu, Q., Niu, K., Zhao, S., Shi, H. (2016). Proteome changes on water-holding capacity of yak longissimus lumborum during postmortem aging. *Meat Sci.* 121:409-419.





ANEXOS



ANEXO I. Identificación, mediante MALDI TOF/TOF MS, de los *spots* de proteína con diferencias en volume entre muestras de carne control y DFD, del músculo *longissimus thoracis* bovino. Fuente: Franco *et al.* 2015a

Spot code ^a	Protein name	Mascot score	Match. / Cov. (%) ^b	Peptides	
				[M+H]	Sequence
C5	Myosin light chain 3 (MYL3)	456	8/56	998.38	EAFTLFDR
				1249.44	EGNGTVMGAELR
				1281.49	ITYGQCQGVLR
				1396.61	ALGQNPTQAEVLR
				1501.53	DTGTIEDFVEGLR
				1509.59	IEFTPEQIEEFK
				2001.70	MMDFDFTFLPMLQHISK
				2637.06	AAAAPAPAPAPPPAPEPSKEPEFDPSK
C6	Myosin light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle (MYL6B)	349	9/47	791.42	VMGAELR
				1025.59	HVLTTLGER
				1042.51	EAFELYDR
				1139.66	IQEPPIDLSK
				1300.65	GSYQDYLEGLR
				1356.64	IQFSQCQGVLR
				1382.78	ALGQNPTNAEVLR
				1724.93	VDFETFLPMLQAVAK
				1746.12	VELPSLIPVILEKPAK
C9	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform (MYL2)	166	8/40	791.29	VFDPEGK
				850.33	DTFAALGR
				1094.38	EMLTQAEK
				1136.38	NEEIDMLK
				1192.45	DGFIDKNDLR
				1240.42	EAFTIMDQNR
				1404.53	GADPEETILNAFK
				1645.67	LKGADPEETILNAFK
C11	Unidentified				
D1	Unidentified				
D2	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B)	299	9/24	1038.47	IPVGPETLGR
				1401.55	IMNVIGEPIDER
				1406.52	AHGGYSVFAGVGER
				1435.60	FTQAGSEVSALLGR
				1439.62	VALTGLTVAEYFR
				1617.62	VALVYQGMNEPPGAR
				1650.74	LVLEVAQHLGESTVR
				1831.68	IMDPNIVGSEHYDVAR
				1987.82	AIAELGIYPAVDPLDSTSR

ANEXO I. *Cont.*

Spot code ^a	Protein name	Mascot score	Match./ Cov. (%) ^b	Peptides	
				[M+H]	Sequence
D3	Triosephosphate isomerase (TPI1)	318	14/67	747.31	EAGITEK
				758.37	VIADNVK
				850.38	VVFEQTK
				954.39	FFVGGNWK
				1137.46	IAVAAQNCYK
				1204.48	SNVSDAVAQ SAR
				1326.55	IYGGSVTGATCK
				1458.59	HVFGESDELIGQK
				1466.59	TATPQQAQEVHEK
				1484.67	NNLGELINTLNAAK
				1539.64	DLGATWVVLGH SER
				1602.71	VVLAYEPVWAIGTGK
				1607.66	VANGAFTGEISPGMIK
				2191.87	VPADTEVVCAPPTAYIDFAR
D5	Cofilin-2 (CFL2)	80	5/29	1000.70	LLPLNDCR
				1024.70	VFNDMKVR
				1322.85	MIYASSKDAIK
				1323.91	AVLFCLSDDKR
				1337.85	YALYDATYETK
D6	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MYLPF)	298	9/60	880.37	FSQEEIK
				884.31	DTFAAMGR
				1173.52	DGIIDKEDLR
				1192.50	EAFVIDQNR
				1319.54	GADPEDVITGAFK
				1524.62	FLEELLTTQCDR
				2016.82	EASGPINFTVFLNMFGEK
				2480.92	AAAEGGSSSVFSMFDQTQIQEFK
D7	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (MYLPF-1)	237	8/56	884.30	DTFAAMGR
				1173.51	DGIIDKEDLR
				1192.49	EAFVIDQNR
				1319.52	GADPEDVITGAFK
				1524.60	FLEELLTTQCDR
				1560.67	LKGADPEDVITGAFK
				2016.80	EASGPINFTVFLNMFGEK
				2480.92	AAAEGGSSSVFSMFDQTQIQEFK

^a Posición de los *spots* de proteína en el gel indicada en la Fig. 7; ^b Péptidos coincidentes y porcentaje de la secuencia polipeptídica cubierta por los péptidos coincidentes.

ANEXO II. Identificación mediante MALDI-TOF MS de los polipéptidos con diferencias en el estatus de fosforilación entre muestras control y DFD del músculo *longissimus thoracis* bovino de la raza Rubia Gallega. Fuente: Mato *et al.* 2019

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	
						Sequence	[M+H] ⁺
1	DFD	Phosphoglucumutase-1 [PGM1(1)]	PGM1_BOVIN	415	23/45	IAAANGIGR	842.55
						LLFADGSR	878.51
						ELLSGPNR	885.52
						EAIQLIVR	941.62
						QQFDLENK	1021.52
						LYIDSYEK	1030.57
						ELEALISDR	1045.60
						NIFDFNALK	1081.62
						LSGTGSAGATIR	1090.62
						ELLSGPNRLK	1126.61
						VSQLEKTGR	1145.59
						QEATLVVGGDGR	1201.68
						IALYETPTGWK	1278.73
						IDAMHGVVGPYVK	1401.78
						AYQDQKPGTSGLR	1420.79
						YDYEEVEAEGANK	1516.73
						FNISNGGPAPEAITDK	1630.87
						TGEHDFGAAFDGDGDR	1666.75
						SMPTSGALDRVANATK	1794.91
						IDNFEYSDPVDGSISR	1813.93
						DGLWAVLAWLSILATR	1864.94
						YDYEEVEAEGANKMMK	1923.02
						LVIGQNGILSTPAVSCIIR	2011.25

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
5	DFD	Unidentified				DHWQK	713.28
						VSQLQEK	831.40
						IAAANGIGR	842.45
						LLFADGSR	878.41
						ELLSGPNR	885.41
						EAIQLIVR	941.51
						QQFDLENK	1021.43
						LYIDSYEK	1030.43
						ELEALISDR	1045.47
						NIFDFNALK	1081.47
						LSGTGSAGATIR	1090.49
						FFGNLMDASK	1145.45
						QEATLVVGGDGR	1201.52
						IALYETPTGWK	1278.58
						IDAMHGVPYPVK	1401.60
						AYQDQKPGTSGLR	1420.61
						FNISNGGPAEAITDK	1630.69
						TGEHDFGAAFDGDGDR	1666.54
						IDNFEYSDPVDGSISR	1813.68
						LSLCGEESFGTGSDHIR	1864.68
						LVIGQNGILSTPAVSCIIR	2010.95

ANEXO II. Cont.

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
6	Control	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (UQCRC1)	QCR1_BOVIN	364	19/47	IAEVDAR	773.35
						SLLTYGR	809.39
						SGMFWLR	896.37
						NRPGNALEK	998.47
						EHTAYYIK	1024.43
						ADLTEYLSR	1067.46
						IPLAEWESR	1100.48
						FTGSQICHR	1105.44
						MVLAAAGGLEHR	1224.56
						RIPLAEWESR	1256.58
						LCTSATESEVLR	1365.56
						EVESMG AHLNAYSTR	1664.63
						LCTSATESEVLRGK	1790.72
						NALVSHLDGTT PVCEDIGR	2053.83
						HFSGLSGTYDEDAVPTLSPCR	2308.86
						VASEQSSQPTCTVGWIDAGSR	2334.90
						AVELLADIVQNCSEDSQIEK	2373.97
						YFYDQCPAVAGFGPIEQLPDYNR	2720.00

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	
						Sequence	[M+H] ⁺
7	DFD	Beta-enolase [ENO3 (1)]	ENOB_BOVIN	269	18/39	GVPLYR	704.44
						LGELYK	722.43
						EILDSR	732.42
						SPDDPAR	757.38
						YDLDFK	800.42
						YNQLMR	824.45
						LSVVDQEK	917.54
						TLGPALLEK	941.59
						KLSVVDQEK	1045.63
						TAIQAAGYPDK	1134.64
						NGKYDLDFK	1179.67
						FMIELDGTENK	1312.69
						GNPTVEVDLHTAK	1380.79
						IEEALGDKAVFAGR	1475.83
						VVIGMDVAASEFYR	1556.87
						VNQIGSVTESIQACK	1633.91
						AAVPSGASTGIYEALRL	1805.05
						LAMQEFMILPVGASSFR	1929.05

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	
						Sequence	[M+H] ⁺
8	DFD	Beta-enolase [ENO3 (2)]	ENOB_BOVIN	253	14/34	GVPLYR	704.44
						SPDDPAR	757.38
						YNQLMR	824.46
						IGAEVYHHLK	1166.68
						FMIELDGTENK	1392.76
						IEEALGDKAVFAGR	1475.83
						VVIGMDVAASEFYR	1556.86
						LAQSNGWGVMSHR	1557.85
						FGANAILGVSLAVCK	1599.88
						VNQIGSVTESIQACK	1633.90
						IGAEVYHHLKGVK	1643.94
						YNQLMRIEEALGDK	1760.04
						AAVPSGASTGIYEALR	1805.04
						LAMQEFMILPVGASSFR	1913.06

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
9	DFD	Beta-enolase [ENO3 (3)]	ENOB_BOVIN	269	21/48	GVPLYR	704.44
						LGELYK	722.44
						EILDSR	732.42
						SPDDPAR	757.38
						YDLDFK	800.42
						YNQLMR	824.45
						RIAQAVEK	914.59
						TLGPALLEK	941.60
						KLSVVDQEK	1045.62
						TAIQAAGYPDK	1134.63
						NGKYDLDFK	1179.67
						FMIELDGTENK	1312.66
						GNPTVEVDLHTAK	1380.77
						IEEALGDKAVFAGR	1475.83
						VVIGMDVAASEFYR	1556.85
						FGANAILGVSLAVCK	1599.88
						VNQIGSVTESIQACK	1633.91
						IGAEVYHHLKGVK	1643.95
						VDKFMIELDGTENK	1654.89
						AAVPSGASTGIYEALRL	1805.05
						LAMQEFMILPVGASSFR	1929.07

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
10	DFD	Actin, alpha skeletal muscle [ACTA1 (1)]	ACTS_BOVIN	474	16/62	CDIDIR	791.41
						IIAPPER	795.51
						AGFAGDDAPR	976.50
						GYSFVTTAER	1130.61
						HQGMVGMGQK	1187.63
						AVFPSIVGRPR	1198.77
						QEYDEAGPSIVHR	1500.79
						DSYVGDEAQSQR	1514.77
						SYELPDGQVITIGNER	1791.00
						VAPEEHPTLLTEAPLNPK	1956.15
						DLYANNVMSGGTTMYPGIADR	2262.16
						MCDEDETTALVCDNGSGLVK	2294.16
						KDLYANNVMSGGTTMYPGIADR	2390.27
						LCYVALDFENEMATAASSSSLEK	2552.29
						TTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIRM	3212.83
						CPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMK	3220.67

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
11	DFD	Actin, alpha 1, skeletal muscle [ACTA1 (2)]	A4IFM8_BOVIN	439	15/51	CDIDIR	791.42
						IIAPPER	795.52
						KGILTLK	852.54
						AGFAGDDAPR	976.50
						GYSFVTTAER	1130.62
						HQGVVMVGMGQK	1187.64
						AVFPSIVGRPR	1198.78
						QEYDEAGPSIVHR	1500.80
						IWHHTFYNELR	1515.84
						SYELPDGQVITIGNER	1791.00
						VAPEEHPTLLTEAPLNPK	1956.15
						DLYANNVMSGGTTMYPGIADR	2246.14
						KDLYANNVMSGGTTMYPGIADR	2390.26
						LCYVALDFENEMATAASSSLEK	2552.27
						TTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIR	3196.82

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
15	DFD	Creatin kinase M-type [CKM (1)]	KCRM_BOVIN	266	16/39	DWPDAR	759.37
						IEEIFK	778.46
						FCVGLQK	851.47
						FEEILTR	907.53
						LMVEMEK	911.53
						ALTLEIYK	950.58
						RFCVGLQK	1007.59
						HGGFKPTDK	1066.60
						GYALPPHCSR	1157.61
						DLFDPIIQDR	1231.69
						GQSIDDMIPAQK	1318.69
						LSVEALNSLTGEFK	1507.79
						GGDDLDPNYVLSSR	1507.79
						LGSSEVEQVQLVVDGVK	1786.04
						GTGGVDTAAVGSVFDVSNADR	1995.05
						RGTGGVDTAAVGSVFDVSNADR	2151.14

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
16	DFD	Creatin kinase M-type [CKM (2)]	KCRM_BOVIN	369	20/49	VISMEK	722.40
						DWPDAR	759.37
						IEEIFK	778.45
						FCVGLQK	851.48
						FEEILTR	907.53
						LMVEMEK	911.52
						ALTLEIYK	950.58
						HGGFKPTDK	986.55
						RFCVGLQK	1007.59
						GYALPPHCSR	1157.61
						PFGNTHNKHK	1179.65
						AEEEYPDLK	1180.61
						DLPDPIIQDR	1231.69
						GGVHVKLAHLK	1245.67
						GQSIDDMIPAQK	1318.68
						GGDDLDPNYVLSSR	1507.79
						LSVEALNSLTGEFK	1507.79
						LGSSEVEQQLVVDGVK	1786.04
						GTGGVDTAAGSVFDVSNADR	1995.04
						RGTGGVDTAAGSVFDVSNADR	2151.14

ANEXO II. Cont.

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
18	Control	Actin, alpha, skeletal muscle [ACTA1(3)]	ACTS_BOVIN	519	11/43	CDIDIR	791.30
						IIAPPER	795.40
						AGFAGDDAPR	976.37
						GYSFVTTAER	1130.45
						HQGVVMVGMGQK	1187.47
						QEYDEAGPSIVHR	1500.58
						SYELPDGQVITIGNER	1790.74
						VAPEEHPTLLTEAPLNPK	1955.86
						DLYANNVMSSGGTTMYPGIADR	2277.81
						LCYVALDFENEMATAASSSSLEK	2551.88
						CPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMK	3220.24
19	Control	Actin, alpha, skeletal muscle [ACTA1 (4)]	ACTS_BOVIN	453	10/39	IIAPPER	795.40
						AGFAGDDAPR	976.37
						GYSFVTTAER	1130.45
						HQGVVMVGMGQK	1187.47
						QEYDEAGPSIVHR	1500.58
						SYELPDGQVITIGNER	1790.74
						VAPEEHPTLLTEAPLNPK	1955.87
						CDEDTTALVCDNGSGLVK	2082.82
						DLYANNVMSSGGTTMYPGIADR	2277.79
						LCYVALDFENEMATAASSSSLEK	2551.93

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	
						Sequence	[M+H] ⁺
20	Control	Actin, alpha, skeletal muscle [ACTA1 (5)]	ACTS_BOVIN	423	12/33	CDIDIR	791.32
						IIAPPER	795.42
						AGFAGDDAPR	976.39
						DLTDYLMK	1014.41
						GYSFVTTAER	1130.48
						HQGMVGMGQK	1203.50
						QEYDEAGPSIVHR	1500.62
						GYSFVTTAEREIVR	1707.65
						SYELPDGQVITIGNER	1790.76
						VAPEEHPTLLTEAPLNPK	1955.89
						DLYANNVMSGGTTMYPGIADR	2277.85
						KDLYANNVMSGGTTMYPGIADR	2726.13
21	Control	Actin, alpha skeletal muscle [ACTA1 (6)]	ACTS_BOVIN	484	12/53	CDIDIR	791.30
						IIAPPER	795.41
						GYSFVTTAER	1130.45
						HQGMVGMGQK	1187.47
						QEYDEAGPSIVHR	1500.58
						SYELPDGQVITIGNER	1790.74
						VAPEEHPTLLTEAPLNPK	1955.87
						MCDEDETTALVCDNGSGLVK	2293.83
						DLYANNVMSGGTTMYPGIADR	2405.88
						TTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIRM	3212.30
						CPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMK	3220.20

ANEXO II. Cont.

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
22	DFD	Troponin T, fast skeletal muscle [Tnnt3 (1)]	TNNT3_BOVIN	66	4/8	YDITNLR	894.49
						VDFDDIQK	979.50
						FEYGEKLG	1093.56
						VDFDDIQKK	1107.57
23	DFD	Troponin T fast skeletal muscle type [Tnnt3 (2)]	Q8MKH7_BOVIN	62	4/13	YDITNLR	894.48
						VDFDDIQK	979.49
						ALSSMGANYSSYLAK	1578.77
						ALSSMGANYSSYLAKADQK	2261.17
24	DFD	Troponin T, fast skeletal muscle [Tnnt3 (3)]	TNNT3_BOVIN	145	7/13	RAEDDLK	846.46
						YDITNLR	894.47
						VDFDDIQK	979.48
						VDFDDIQKK	1107.54
						QKYDITNLR	1150.63
						LTAPKIPGEK	1182.61
						IPEGEKVDFDDIQK	1632.81
25	DFD	Troponin T, fast skeletal muscle [Tnnt3 (4)]	TNNT3_BOVIN	60	5/13	YDITNLR	894.51
						VDFDDIQK	979.51
						VDFDDIQKK	1107.59
						ALSSMGANYSSYLAK	1578.81
						IPEGEKVDFDDIQK	1632.87
26	DFD	F-actin-capping protein subunit alpha-2 (CAPZA2)	CAZA2_BOVIN	74	5/16	QLPVTR	713.44
						TSVETALR	876.49
						IGKEMQNA	890.48
						LLNNDNLLR	1197.72
						MADLEEQLSDEEKVR	1791.84

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
27	Control	Actin, alpha skeletal muscle [ACTA1 (7)]	ACTS_BOVIN	300	7/23	IIAPPER	795.39
						GYSFVTTAER	1130.46
						QEYDEAGPSIVHR	1500.60
						GYSFVTTAEREIVR	1707.63
						SYELPDGQVITIGNER	1790.73
						VAPEEHPTLLTEAPLNPK	1955.85
						CDEDETTALVCDNGSGLVK	2082.80
30	Control	Troponin T, slow skeletal muscle [TNNT1 (1)]	TNNT1_BOVIN	109	6/20	IPEGER	700.30
						FDLMAK	740.30
						VDFDDIHR	1016.40
						ISHAQKFR	1066.42
						YEINVLYNR	1183.51
30A	DFD	Troponin T, slow skeletal muscle [TNNT1 (2)]	TNNT1_BOVIN	71	5/14	DLLELQTLIDVHFEQR	1968.85
						IPEGER	700.38
						QTGREMK	865.53
						VDFDDIHR	1016.52
						ISHAQKFR	1066.54
33	Control	Heat shock protein beta-1 [HSPB1 (1)]	HSPB1_BOVIN	230	5/36	YEINVLYNR	1183.66
						LFDQAFGLPR	1163.48
						ALPAAAIEGPAYNR	1413.57
						VSLDVNHFAPEELTVK	1797.69
						SATQSAEITIPVTFQAR	1819.72
34	DFD	Heat shock protein beta-1 [HSPB1 (2)]	E1BEL7_BOVIN	159	3/20	AQLGGPEAGKSEQPENK	1819.72
						LFDQAFGLPR	1163.60
						ALPAAAIEGPAYNR	1413.71
						SATQSAEITIPVTFQAR	1819.91

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
37	DFD	Heat shock protein beta-1 [HSPB1 (3)]	E1BEL7_BOVIN	163	4/27	LFDQAFGLPR	1163.60
						ALPAAAIEGPAYNR	1413.72
						QLSSGVSEIQQTADR	1618.79
						SATQSAEITIPVTFQAR	1819.92
44	Control	Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle [MYL6B (1)]	Q148H2_BOVIN	109	6/26	VMGAELR	791.34
						EAFELYDR	1042.41
						IQEPPIDLSK	1139.52
						GSYQDYLEGLR	1300.49
						ALGQNPTNAEVLR	1382.62
						IQEPPIDLSKVVIEFNK	1968.88
46	Control	Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle [MYL6B (2)]	Q148H2_BOVIN	329	15/58	VMGAELR	791.34
						VVIEFNK	848.41
						DQLEEFK	908.37
						HVLTTLGER	1025.48
						EAFELYDR	1042.39
						VFDKEQNGK	1064.45
						IQEPPIDLSK	1139.53
						GSYQDYLEGLR	1300.50
						IQFSQCGDVMR	1356.48
						ALGQNPTNAEVLR	1382.62
						VDFETFLPMLQAVAK	1724.72
						VVIEFNKDQLEEFK	1737.75
						VELPSLIPVILEKPAK	1745.91
						RVDFETFLPMLQAVAK	1880.82
						DQLEEFKEAFELYDR	1931.74

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	[M+H] ⁺
						Sequence	
50	Control	Heat shock protein beta-6 (HSPB6)	HSPB6_BOVIN	146	3/39	HFSPEEIAVK	1156.48
						ASAPLPGLSAPGR	1193.54
						LPPGVDPAAVTSALSPE	3912.67
51	Control	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform [MYL2 (1)]	MLRV_BOVIN	399	10/65	VFDPEGK	791.31
						DTFAALGR	850.35
						EMLTTQAER	1094.40
						NEEIDMLK	1136.38
						DGFIDKNDLR	1192.46
						EAFIMDQNR	1240.43
						GADPEETILNAFK	1404.53
						EAPGPINFTVFLQMFGE	2040.76
						EEIDQMFAAFPPDVTGN	2415.82
						FSKEEIDQMFAAFPPDV	2778.03
52	Control	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform [MYL2 (2)]	F1ME15_BOVIN	380	11/76	VFDPEGK	791.28
						DTFAALGR	850.32
						EMLTTQAER	1094.36
						NEEIDMLK	1136.35
						DGFIDKNDLR	1192.43
						EAFIMDQNR	1240.39
						GADPEETILNAFK	1404.50
						EAPGPINFTVFLQMFGEK	2040.71
						EEIDQMFAAFPPDVTGNL	2415.77
						AEGANSNVFSMFEQTQI	2420.78
						RAEGANSNVFSMFEQTQI	2576.86

ANEXO II. *Cont.*

Spot No ^a .	Type of meat	Protein identity	Accession	Mascot score	Match/Cov. (%) ^b	Peptide	
						Sequence	[M+H] ⁺
53	DFD	Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform [MYLPF (1)]	MLRS_BOVIN	363	10/61	DTFAAMGR	868.35
						FSQEEIK	880.39
						DGIIDKEDLR	1173.55
						EAFVIDQNR	1192.53
						GADPEDVITGAFK	1319.57
						FLELLTTQCDR	1524.65
						LKGADPEDVITGAFK	1560.73
						EASGPINFTVFLNMFGEK	2016.83
						AAAEKGSSSVFSMFDQTQIQEFK	2480.95
						RAAAEGGSSSVFSMFDQTQIQEFK	2716.87
54	DFD	Myosin regulatory light chain 2, fast skeletal muscle isoform [MYLPF (2)]	MLRS_BOVIN	88	4/23	DTFAAMGR	884.35
						DGIIDKEDLR	1173.55
						EAFVIDQNR	1192.53
						FLELLTTQCDR	1524.64

^a Posición de los *spots* de proteína en el gel indicada en la Fig. 8; ^b Péptidos coincidentes y porcentaje de la secuencia polipeptídica cubierta por los péptidos coincidentes.

